

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

(21) **PI 0713000-7 A2**

(22) Data de Depósito: 12/06/2007
(43) Data da Publicação: 08/01/2013
(RPI 2192)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/28
A61K 39/395
A61P 35/00
A61P 31/00

(54) **Título:** PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO DE CADEIA ÚNICA MULTIVALENTE COM FUNÇÃO EFETIVA

(30) **Prioridade Unionista:** 12/06/2006 US 60/813.261, 20/10/2006 US 60/823.287

(73) **Titular(es):** Trubion Pharmaceuticals, Inc.

(72) **Inventor(es):** Jeffrey A. Ledbetter, Laura Sue Grosmaire, Lioudmila Tchistiakova, Martha S. Hayden-Ledbetter, Maximillian T. Follettie, Peter Armstrong Thompson, Robert Bader, Valerie Calabro, William Brady

(74) **Procurador(es):** Flávia Salim Lopes

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007071052 de 12/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/146968de 21/12/2007

(57) **Resumo:** PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO MULTIVALENTE DE CADEIA SIMPLAS COM FUNÇÃO EFETORA São fornecidos peptídeos de ligação multivalentes, incluindo pepetídeos de ligação bioespecíficos, que possuem função efetora de imunoglobulina juntamente com ácidos nucleicos codificadores, vetores e células hospedeiras, além de métodos para a produção desses peptídeos e métodos para sua utilização para o tratamento ou prevenção de diversas doenças, distúrbios ou condições, bem como para atenuar menos um sintoma associado a essas doenças, distúrbios ou condições.



PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO MULTIVALENTES DE CADEIA SIMPLES COM
FUNÇÃO EFETORA

CAMPOS DA INVENÇÃO

A invenção está relacionada de forma geral ao campo
5 das moléculas de ligação multivalentes e aplicações
terapêuticas destas.

A listagem de seqüências está sendo submetida como um
arquivo de texto e como um arquivo em PDF em conformidade
com as exigências aplicáveis para depósito eletrônico. A
10 listagem de seqüências foi criada em 12 de junho de 2007. A
listagem de seqüências é aqui incorporada por referência em
sua totalidade.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Em um mamífero saudável, o sistema imunológico protege
15 o corpo contra lesões por substâncias estranhas e
patógenos. No entanto, em alguns casos, o sistema
imunológico apresenta um mau funcionamento, produzindo
lesão traumática e/ou doença. Por exemplo, as células B
podem produzir anticorpos que reconhecem autoproteínas, e
20 não proteínas estranhas, levando à produção dos auto-
anticorpos característicos de doenças autoimunes como, por
exemplo, lúpus eritematoso, artrite reumatóide, e
semelhantes. Em outros casos, o efeito tipicamente benéfico
do sistema imunológico no combate a materiais estranhos é
25 contra-produtivo, por exemplo, após um transplante de
órgão. Foi reconhecido o poder do sistema imunológico de
mamíferos e, em particular, do sistema imunológico humano,
e foram feitos esforços para controlar o sistema para
evitar ou atenuar as conseqüências deletérias à saúde que
30 resultam do funcionamento normal do sistema imunológico em

um ambiente anormal (por exemplo, transplante de órgão) ou do funcionamento anormal do sistema imunológico em um ambiente de outro modo aparentemente normal (por exemplo, progressão de doença autoimune). Adicionalmente, foram

5 feitos esforços para explorar o sistema imunológico a fim de gerar diversas metodologias diagnósticas e terapêuticas alvo-específicas que se baseiam na capacidade de anticorpos para reconhecer e se ligar especificamente a alvos antigênicos com especificidade.

10 Uma forma pela qual o sistema imunológico protege o corpo é pela produção de células especializadas denominadas linfócitos B ou células B. As células B produzem anticorpos que se ligam e, em alguns casos, medeiam a destruição de uma substância estranha ou um patógeno. No entanto, em

15 alguns casos, o sistema imunológico humano e, especificamente, os linfócitos B do sistema imunológico humano, apresentam um mau funcionamento e uma doença é causada. Há vários cânceres que envolvem a proliferação descontrolada de células B. Também há várias doenças

20 autoimunes que envolvem a produção de anticorpos por células B que, em vez de se ligarem às substâncias estranhas e aos patógenos, se ligam a partes do corpo. Além disso, há diversas doenças autoimunes e inflamatórias que envolvem as células B em sua patologia, por exemplo, por

25 meio da apresentação de antígeno inadequada das células B às células T, ou por meio de outras vias que envolvem células B. Por exemplo, camundongos com tendência autoimune deficientes em células B não desenvolvem doença renal autoimune, vasculite ou auto-anticorpos (Shlomchik e cols.,

30 *J. Exp. Med.* 1994, 180: 1.295-306). Curiosamente, esses

mesmos camundongos com tendência autoimune que possuem células B, mas são deficientes na produção de imunoglobulinas, desenvolvem doenças autoimunes quando induzidos experimentalmente (Chan e cols., *J. Exp. Med.* 5 1999, 189: 1.639-48), indicando que as células B têm uma participação integral no desenvolvimento de doença autoimune.

As células B podem ser identificadas por moléculas em sua superfície celular. CD20 foi a primeira molécula de 10 superfície específica para a linhagem de células B humanas identificada por um anticorpo monoclonal. Ela é uma fosfoproteína hidrofóbica transmembrana de células B não glicosilada de 35 kDa que tem tanto sua extremidade amino quanto sua extremidade carbóxi situadas dentro da célula 15 (Einfeld e cols., *EMBO J.* 1988, 7: 711-17). CD20 é expresso por todas as células B maduras normais, mas não é expressa por células B precursoras ou células plasmáticas. Não foram identificados ligantes naturais para CD20, e a função de CD20 na biologia das células B ainda não é totalmente 20 compreendida.

Outra molécula da superfície celular específica para a linhagem de células B é CD37. CD37 é uma proteína altamente glicosilada de 40-52 kDa que pertence à família de tetraspanina transmembrana de antígenos da superfície 25 celular. Ela atravessa a membrana celular quatro vezes, formando duas alças extracelulares e expondo suas extremidades amino e carbóxi ao citoplasma. CD37 é altamente expresso em células B (sIg+) produtoras de anticorpos normais, mas não é expresso em pré-células B ou 30 em células plasmáticas. A expressão de CD37 em células T em

repouso e ativadas, monócitos e granulócitos é baixa, e não há expressão de CD37 detectável em células NK (natural killer), plaquetas ou eritrócitos. Veja Belov e cols., *Cancer Res.*, 61(11): 4.483-4.489 (2001); Schwartz-Albiez e cols., *J. Immunol.*, 140(3): 905-914 (1988); e Link e cols., *J. Immunol.*, 137(9): 3.013-3.018 (1988). Além das células B normais, quase todas as malignidades de origem nas células B são positivas para a expressão de CD37, incluindo leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma não Hodgkin (NHL) e leucemia de células pilosas (Moore, e cols. 1987; Merson e Brochier 1988; Faure, e cols. 1990). CD37 participa da regulação da função de célula B, já que se verificou que camundongos desprovidos de CD37 possuem níveis baixos de IgG1 sérica e possuem resposta humoral deficiente aos antígenos virais e a antígenos-modelo. Parece que atua como uma molécula co-estimulante não clássica ou por influência direta na apresentação de antígeno por meio da formação de complexo com moléculas de MHC da classe II. Veja Knobloch e cols., *Mol. Cell. Biol.*, 20(15): 5.363-5.369 (2000).

Ocorreu o desenvolvimento de pesquisas e de fármacos com base no conceito de que as próprias moléculas da superfície celular específicas para a linhagem de células B como, por exemplo, CD37 e CD20, podem ser alvos para anticorpos que se ligariam e mediarão a destruição de células B cancerígenas e que causam doenças autoimunes que possuem CD37 e CD20 em suas superfícies. Tendo sido denominado "imunoterapia", os anticorpos feitos (ou baseados em anticorpos feitos) em um animal não humano que se ligam ao CD37 ou CD20 foram dados a um paciente para

eliminar células B cancerígenas ou que causam doenças autoimunes.

A tecnologia de anticorpo monoclonal e métodos de engenharia genética facilitaram o desenvolvimento de moléculas de imunoglobulina para o diagnóstico e tratamento de doenças humanas. A estrutura do domínio de imunoglobulinas é passível de manipulação, pelo fato de que os domínios de ligação de antígeno e os domínios que conferem funções efetoras podem ser trocados entre classes e subclasses de imunoglobulina. A estrutura e a função de imunoglobulinas são revisadas, por exemplo, em Harlow e cols., Eds., "Antibodies: A Laboratory Manual", Capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988). Uma introdução extensa, bem como informações detalhadas sobre todos os aspectos da tecnologia de anticorpo recombinante, pode ser encontrada no livro texto "Recombinant Antibodies" (John Wiley & Sons, NY, 1999). Uma coleção abrangente de protocolos laboratoriais detalhados da engenharia de anticorpos pode ser encontrada em R. Kontermann e S. Diibel (eds.), "The Antibody Engineering Lab Manual" (Springer Verlag, Heidelberg/Nova York, 2000).

Uma molécula de imunoglobulina (abreviadamente Ig) é uma proteína multimérica, tipicamente composta por dois polipeptídeos de cadeia leve idênticos e dois polipeptídeos de cadeia pesada idênticos (H_2L_2) que são unidos em um complexo macromolecular por ligações dissulfeto intercadeias, ou seja, ligações covalentes entre os grupos sulfidrila de resíduos de cisteína vizinhos. São definidas cinco classes de imunoglobulina humana com base na sua composição de cadeia pesada, e são denominadas IgG, IgM,

IgA, IgE e IgD. Os anticorpos da classe IgG e da classe IgA são ainda divididos em subclasses, especificamente, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, e IgA1 e IgA2, respectivamente. As ligações dissulfeto intercadeias unem diferentes áreas da
5 mesma cadeia polipeptídica, o que resulta na formação de alças que, junto com aminoácidos adjacentes, constituem os domínios da imunoglobulina. Na porção do terminal amino, cada cadeia leve e cada cadeia pesada possuem uma única região variável que apresenta uma variação considerável na
10 composição de aminoácidos de um anticorpo para outro. A região variável da cadeia leve, V_L , possui um único domínio de ligação de antígeno e se associa à região variável de uma cadeia pesada, V_H (que também contém um único domínio de ligação de antígeno), para formar o sítio de ligação de
15 antígeno da imunoglobulina, o Fv.

Além de regiões variáveis, cada uma das cadeias do anticorpo de comprimento total possui uma região constante que contém um ou mais domínios. As cadeias leves possuem uma região constante que contém um único domínio. Dessa
20 forma, as cadeias leves possuem um domínio variável e um domínio constante. As cadeias pesadas possuem uma região constante que contém vários domínios. As cadeias pesadas nos anticorpos IgG, IgA e IgD possuem três domínios, que são designados C_{H15} , C_{H25} e C_{H3} ; as cadeias pesadas nos
25 anticorpos IgM e IgE possuem quatro domínios, C_{H15} , C_{H25} , C_{H3} e C_{H4} . Dessa forma, as cadeias pesadas possuem um domínio variável e três ou quatro domínios constantes. Vale ressaltar a organização constante desses domínios em todas as espécies conhecidas, com as regiões constantes contendo
30 um ou mais domínios estando localizadas no terminal C ou

próximas a ele de ambas as cadeias leves e pesadas de moléculas de imunoglobulina, com os domínios variáveis localizados em direção aos terminais N das cadeias leves e pesadas. A estrutura e a função das imunoglobulinas são
5 revisadas, por exemplo, em Harlow e cols., Eds., "Antibodies: A Laboratory Manual", Capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988).

As cadeias pesadas das imunoglobulinas também podem ser divididas em três regiões funcionais: a região Fd (um
10 fragmento que compreende V_H e C_{H1} , ou seja, os dois domínios do terminal N da cadeia pesada), a região de dobradiça (*hinge*) e a região Fc (a região do "fragmento cristalizável"). A região Fc contém os domínios que interagem com receptores de imunoglobulina nas células e
15 com os elementos iniciais da cascata do complemento. Dessa forma, a região ou fragmento Fc é geralmente considerada responsável pelas funções efetoras de uma imunoglobulina como, por exemplo, ADCC (citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células), CDC (citotoxicidade
20 dependente de complemento) e fixação de complemento, ligação aos receptores Fc, maior meia-vida *in vivo* em relação a um polipeptídeo que não possui uma região Fc, ligação de proteína A e, talvez, até mesmo transferência placentária (Capon e cols., *Nature*, 337: 525-531, (1989)).
25 Além disso, um polipeptídeo que contém uma região Fc permite a dimerização/multimerização do polipeptídeo. Esses termos também são usados para regiões análogas das outras imunoglobulinas.

Embora todos os isótipos de imunoglobulina humana
30 contenham uma estrutura reconhecível em comum, cada isótipo

exibe um padrão distinto de função efetora. IgG, apenas como exemplo, neutraliza toxinas e vírus, opsoniza, fixa complemento (CDC) e participa na ADCC. IgM, em contraste, neutraliza patógenos sangüíneos e participa da opsonização.

5 IgA, quando associada à sua porção secretora, é secretada e fornece uma defesa primária à infecção microbiana através da mucosa; ela também neutraliza toxinas e apóia a opsonização. IgE medeia respostas inflamatórias, estando centralmente envolvida no recrutamento de outras células

10 necessárias para montar uma resposta completa. IgD é conhecida por fornecer uma função imunorreguladora, controle da ativação de células B. Essas caracterizações de funções efetoras de isótipos fornecem uma ilustração não abrangente das diferenças que podem ser encontradas dentre

15 os isótipos humanos.

A região de dobradiça, encontrada nos anticorpos das classes IgG, IgA, IgD e IgE, atua como um espaçador flexível, permitindo que a porção Fab se mova livremente no espaço. Em contraste com as regiões constantes, os domínios

20 de dobradiça são estruturalmente diversos, variando tanto em seqüência quanto em comprimento entre as classes e subclasses de imunoglobulinas. Por exemplo, o comprimento e a flexibilidade da região de dobradiça variam entre as subclasses de IgG. A região de dobradiça de IgG1 engloba os

25 aminoácidos 216-231 e, por ser livremente flexível, os fragmentos Fab podem girar em torno de seus eixos de simetria e se mover dentro de uma esfera centrada na primeira das duas pontes dissulfeto intercadeias pesadas. IgG2 possui uma dobradiça mais curta do que IgG1, com 12

30 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. A

região de dobradiça de IgG2 não possui um resíduo de glicina, é relativamente curta, e contém uma hélice dupla rígida de poliprolina, estabilizada por pontes dissulfeto intercadeias pesadas extras. Essas propriedades restringem a flexibilidade da molécula de IgG2. IgG3 difere das outras subclasses por sua região de dobradiça estendida única (com um comprimento de cerca de quatro vezes o da dobradiça de IgG1), que contém 62 aminoácidos (incluindo 21 prolinas e 11 cisteínas), formando uma hélice dupla inflexível de poliprolina. Em IgG3, os fragmentos Fab são relativamente distantes do fragmento Fc, o que dá à molécula uma maior flexibilidade. A dobradiça alongada em IgG3 também é responsável por seu peso molecular mais elevado, comparada com as outras subclasses. A região de dobradiça de IgG4 é mais curta do que a de IgG1, e sua flexibilidade é intermediária entre a de IgG1 e de IgG2. A flexibilidade das regiões de dobradiça relatadas diminui na ordem IgG3>IgG1>IgG4>IgG2. As quatro subclasses de IgG também diferem entre elas com relação às suas funções efetoras. Essa diferença está relacionada às diferenças em termos de estrutura, incluindo diferenças com relação à interação entre a região variável, os fragmentos Fab e o fragmento Fc constante.

De acordo com estudos cristalográficos, a região de dobradiça de imunoglobulina pode ainda ser subdividida funcionalmente em três regiões: a região de dobradiça superior, a região central e a região de dobradiça inferior (Shin e cols., 1992 *Immunological Reviews* 130: 87). A região de dobradiça superior inclui aminoácidos da extremidade carboxil de C_{H1} ao primeiro resíduo na

dobradiça que restringem o movimento, geralmente o primeiro resíduo de cisteína que forma uma ligação dissulfeto intercadeias entre as duas cadeias pesadas. O comprimento da região de dobradiça superior está relacionado à flexibilidade segmentar do anticorpo. A região de dobradiça central contém as pontes dissulfeto intercadeias pesadas, e a região de dobradiça inferior une a extremidade do terminal amino do domínio C_{H2} e inclui resíduos em C_{H2} . Id. A região de dobradiça central da IgG1 humana contém a seqüência Cys-Pro-Pro-Cys que, quando dimerizada por formação de ligação dissulfeto, resulta em um octapeptídeo cíclico que supostamente atua como um pivô, conferindo, dessa forma, flexibilidade. A região de dobradiça também pode conter um ou mais sítios de glicosilação, que incluem diversos tipos estruturalmente distintos de sítios para adesão de carboidrato. Por exemplo, IgA1 contém cinco sítios de glicosilação dentro de um segmento de 17 aminoácidos da região de dobradiça, o que confere resistência da polipeptídeo da região de dobradiça às proteases intestinais, considerada uma propriedade vantajosa para uma imunoglobulina secretora.

Mudanças conformacionais permitidas pela estrutura e flexibilidade da região de dobradiça da seqüência de polipeptídeos da imunoglobulina também podem afetar as funções efetoras da porção Fc do anticorpo. As três categorias gerais de funções efetoras associadas à região Fc incluem: (1) ativação da cascata clássica do complemento, (2) interação com células efetoras, e (3) compartimentalização de imunoglobulinas. As diferentes subclasses da IgG humana variam nas eficácias relativas com

as quais fixam complemento, ou ativam e amplificam as etapas da cascata do complemento. Veja, por exemplo, Kirschfink, 2001 *Immunol. Rev.* 180: 177; Chakraborti e cols., 2000 *Cell Signal* 12: 607; Kohl e cols., 1999 *Mol. Immunol.* 36: 893; Marsh e cols., 1999 *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 8: 557; Speth e cols., 1999 *Wien Klin. Wochenschr.* 111: 378.

Exceções à estrutura H_2L_2 de anticorpos convencionais ocorrem em alguns isótipos das imunoglobulinas encontradas em camelídeos (camelos, dromedários e lhamas; Hamers-Casterman e cols., 1993 *Nature* 363: 446; Nguyen e cols., 1998 *J. Mol. Biol.* 275: 413), cações-lixas (*nurse sharks*) (Roux e cols., 1998 *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 11.804), e na quimera americana (*spotted ratfish*) (Nguyen, e cols., 2002 *Immunogenetics* 54(1): 39-47). Esses anticorpos podem formar aparentemente regiões de ligação de antígeno usando apenas a região variável da cadeia pesada, ou seja, esses anticorpos funcionais são homodímeros somente de cadeias pesadas (denominados "anticorpos de cadeia pesada" ou "HCAbs"). Apesar das vantagens da tecnologia de anticorpo no diagnóstico e tratamento de doenças, há alguns aspectos desvantajosos no desenvolvimento de tecnologias de anticorpos inteiros como reagentes diagnósticos e/ou terapêuticos. Anticorpos inteiros são estruturas protéicas grandes exemplificadas pela estrutura heterotetramérica do isótipo IgG, que contém duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Essas moléculas grandes criam obstáculos estéricos em certas aplicações. Por exemplo, nos tratamentos de tumores sólidos, anticorpos inteiros não penetram facilmente no interior do tumor. Além

disso, o tamanho relativamente grande de anticorpos inteiros cria um desafio para assegurar que a administração *in vivo* de moléculas desse tipo não induza uma resposta imune. Além disso, a geração de moléculas de anticorpo ativo tipicamente envolve o cultivo de células eucarióticas recombinantes capazes de fornecer processamento pós-tradução apropriado das moléculas nascentes do anticorpo, e essas células podem ser de difícil cultivo e de difícil indução de uma forma que gere rendimentos comercialmente úteis do anticorpo ativo.

Recentemente, foram construídas moléculas de imunoglobulina menores para superar problemas associados às metodologias de imunoglobulinas inteiras. Um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples (scFv) compreende um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo unido por meio de um peptídeo curto a um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (Huston e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85: 5.879-83). Em função do pequeno tamanho das moléculas de scFv, elas exibem uma penetração mais eficaz em tecidos do que imunoglobulinas inteiras. Um scFv antitumoral exibiu uma penetração tumoral mais rápida e uma distribuição mais equilibrada por toda a massa tumoral do que o anticorpo quimérico correspondente (Yokota e cols., *Cancer Res.* 1992, 52: 3.402-08).

Apesar das vantagens que as moléculas de scFv trazem à soroterapia, existem várias desvantagens em relação a essa abordagem terapêutica. Um scFv é depurado rapidamente da circulação, o que pode reduzir os efeitos tóxicos em células normais, mas essa depuração rápida impede a liberação de uma dose eficaz mínima ao tecido-alvo. A

5 fabricação de quantidades adequadas de scFv para administração aos pacientes tem sido desafiadora, em função das dificuldades na expressão e no isolamento de scFv que afetam de forma adversa o rendimento. Durante a expressão, as moléculas de scFv não têm estabilidade e frequentemente se agregam por causa do pareamento de regiões variáveis de diferentes moléculas. Além disso, os níveis de produção de moléculas de scFv em sistemas de expressão em mamíferos são baixos, limitando o potencial para uma fabricação eficiente de moléculas de scFv para terapia (Davis e cols., *J. Biol. Chem.* 1990, 265: 10.410-18); Traunecker e cols., *EMBO J.* 1991, 10: 3.655-59). Foram exploradas estratégias para o aumento da produção, incluindo a adição de sítios de glicosilação às regiões variáveis (Jost, C.R. Patente U.S. N° 5.888.773, Jost e cols., *J. Biol. Chem.* 1994, 69: 26.267-73).

Outra desvantagem em relação à utilização de scFv para terapia é a ausência de função efetora. Um scFv sem uma função citolítica, por exemplo, a citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células (ADCC) e a citotoxicidade dependente de complemento (CDC) associadas à região constante de uma imunoglobulina, pode ser ineficaz para o tratamento de doenças. Embora o desenvolvimento da tecnologia de scFv tenha começado há mais de 12 anos, atualmente não há produtos de scFv aprovados para terapia.

Alternativamente, foi proposto que a fusão de um scFv a outra molécula, por exemplo, uma toxina, se beneficiaria da atividade de ligação de antígeno específica e do pequeno tamanho de um scFv para liberar a toxina a um tecido-alvo (Chaudary e cols., *Nature* 1989, 339: 394; Batra e cols.,

Mol. Cell. Biol. 1991, 11: 2.200). Portanto, a conjugação ou fusão de toxinas aos scFvs foi oferecida como uma estratégia alternativa para gerar moléculas antígeno-específicas potentes, mas a dosagem desses conjugados ou quimeras pode ser limitada por toxicidade excessiva e/ou inespecífica em função da porção de toxina dessas preparações. Os efeitos tóxicos podem incluir elevação suprafisiológica das enzimas hepáticas e síndrome de extravasamento vascular, e outros efeitos indesejados. Além disso, as próprias imunotoxinas são altamente imunogênicas mediante administração a um hospedeiro, e os anticorpos do hospedeiro gerados contra a imunotoxina limitam sua utilidade potencial para tratamentos terapêuticos repetidos de um indivíduo.

O tratamento não cirúrgico do câncer, por exemplo, irradiação externa e quimioterapia, pode sofrer de eficácia limitada por causa dos efeitos tóxicos sobre tecidos e células normais, em função da ausência de especificidade que esses tratamentos exibem em relação às células cancerígenas. Para superar essa limitação, foram desenvolvidas metodologias de tratamento direcionado para aumentar a especificidade do tratamento para as células e tecidos que dele necessitam. Um exemplo de uma metodologia direcionada desse tipo para uso *in vivo* é a administração de conjugados de anticorpos, com o anticorpo designado para reconhecer especificamente um marcador associado a uma célula ou tecido que necessita de tratamento, e o anticorpo estando conjugado a um agente terapêutico, por exemplo, uma toxina, no caso do tratamento de câncer. Anticorpos, como agentes sistêmicos, circulam até compartimentos sensíveis e

indesejáveis do corpo, por exemplo, a medula óssea. Na lesão aguda por radiação, a destruição de compartimentos linfóides e hematopoiéticos é um fator importante no desenvolvimento de septicemia e subsequente morte. Além
5 disso, os anticorpos são proteínas globulares grandes que podem exibir uma penetração baixa de tecidos que necessitam de tratamento.

Pacientes humanos e indivíduos não humanos que sofrem de diversos processos de doença em estágio final
10 freqüentemente necessitam de transplante de órgão. O transplante de órgão, no entanto, deve competir com a resposta imune adversa do receptor e luta contra a rejeição imunológica do órgão transplantado por depressão da resposta imune celular do receptor ao órgão estranho com
15 agentes citotóxicos que afetam as partes linfóides e outras partes do sistema hematopoiético. A aceitação do enxerto é limitada pela tolerância do receptor a essas substâncias químicas citotóxicas, muitas das quais são similares aos agentes anticâncer (antiproliferativos). Da mesma forma,
20 quando se utilizam agentes antimicrobianos citotóxicos, particularmente fármacos antivirais, ou quando se utilizam fármacos citotóxicos para o tratamento de doenças autoimunes, por exemplo, no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico, uma limitação séria são os efeitos tóxicos dos
25 agentes terapêuticos na medula óssea e nas células hematopoiéticas do corpo.

O uso de terapias direcionadas, por exemplo, terapia direcionada de conjugados de anticorpos, é planejado para localizar uma quantidade máxima do agente terapêutico no
30 local de ação desejado, como possível, e o sucesso dessas

terapias é revelado pela proporção relativamente elevada de sinal em relação ao nível de fundo de agente terapêutico. Exemplos de anticorpos direcionados incluem conjugados de agentes diagnósticos ou terapêuticos de anticorpo ou 5 fragmentos de anticorpo, peptídeos com especificidade de célula ou de tecido, e hormônios e outras moléculas de ligação de receptor. Por exemplo, foram usados anticorpos contra determinantes diferentes associados às células patológicas e normais, bem como associados a 10 microorganismos patogênicos, para a detecção e tratamento de uma ampla gama de condições patológicas ou lesões. Nesses métodos, o anticorpo de direcionamento é conjugado diretamente a um agente de detecção ou terapêutico apropriado, como descrito, por exemplo, em Hansen e cols., 15 Patente U.S. N° 3.927.193 e Goldenberg, Patentes U.S. N°s 4.331.647, 4.348.376, 4.361.544, 4.468.457, 4.444.744, 4.460.459, 4.460.561, 4.624.846 e 4.818.709.

Um problema encontrado nos métodos de direcionamento diretos, ou seja, em métodos nos quais o agente diagnóstico 20 ou terapêutico (o "agente ativo") é conjugado diretamente à porção de direcionamento, é que uma fração relativamente pequena do conjugado realmente se liga ao local-alvo, enquanto a maioria do conjugado permanece na circulação e compromete, de uma forma ou de outra, a função do conjugado 25 direcionado. Para assegurar a localização máxima do agente ativo, é administrado tipicamente um excesso do conjugado direcionado, assegurando que um pouco do conjugado irá permanecer não ligado e contribuirá para os níveis de fundo do agente ativo. Um conjugado diagnóstico, por exemplo, um 30 conjugado de imagem radioimunocintigráfico ou por

ressonância magnética que não se ligue ao seu alvo, pode permanecer em circulação, aumentando, dessa forma, o nível de fundo e diminuindo a resolução da técnica diagnóstica. No caso de um conjugado terapêutico que possui uma toxina
5 como agente ativo (por exemplo, um radioisótopo, fármaco ou composto tóxico) anexada a uma porção de direcionamento de circulação prolongada como, por exemplo, anticorpo, o conjugado circulante pode produzir uma toxicidade inaceitável ao hospedeiro, por exemplo, toxicidade para a
10 medula ou efeitos colaterais sistêmicos.

A Patente U.S. N° 4.782.840 revela um método para a redução do efeito dos níveis elevados da radiação de fundo durante cirurgia. O método envolve a injeção de um paciente com anticorpos específicos para tecido neoplásico, com os
15 anticorpos marcados com radioisótopos que possuem uma meia-vida adequadamente longa, por exemplo, Iodo-125. Após injeção do anticorpo marcado radioativamente, a cirurgia é retardada em pelo menos 7-10 dias, preferivelmente 14-21 dias, para permitir que qualquer anticorpo marcado
20 radioativamente não ligado seja depurado a um nível de fundo.

A Patente U.S. N° 4.932.412 revela métodos para a redução ou correção de uma radiação de fundo inespecífica durante detecção intra-operatória. Os métodos incluem a
25 administração a um paciente que recebeu um anticorpo primário marcado radioativamente de um agente de contraste, e a subtração do agente ou segundo anticorpo que se liga ao anticorpo primário.

Além da produção dos anticorpos descritos acima, o
30 sistema imunológico inclui diversos tipos de células que

possuem efeitos biológicos poderosos. Durante a hematopoiese, células-tronco derivadas da medula óssea se diferenciam em células maduras do sistema imunológico (células "B") ou em precursores de células que migram para
5 fora da medula óssea para amadurecerem no timo (células "T").

As células B são fundamentais para o componente humoral de uma resposta imune. As células B são ativadas por uma apresentação apropriada de um antígeno, para se
10 tornarem células plasmáticas secretoras de anticorpos; a apresentação de antígeno também resulta em uma expansão clonal das células B ativadas. As células B são primariamente responsáveis pelo componente humoral de uma resposta imune. Uma célula plasmática exibe tipicamente
15 cerca de 10^5 moléculas de anticorpo (IgD e IgM) em sua superfície.

Os linfócitos T podem ser divididos em duas categorias. As células T citotóxicas, linfócitos Tc ou CTLs (células T CD8+) matam células que abrigam antígeno de
20 superfície estranho em associação com MHC da Classe I, e podem matar células que possuem parasitas intracelulares (bactérias ou vírus), desde que a célula infectada exiba um antígeno microbiano em sua superfície. As células Tc matam células tumorais e são responsáveis pela rejeição de
25 células transplantadas. As células Tc reconhecem complexos de antígeno-MHC da Classe I em células-alvo, entram em contato com eles, e liberam o conteúdo de grânulos diretamente na membrana da célula-alvo, o que lisa a célula.

30 Uma segunda categoria de células T consiste nas

células T *helper* ou linfócito Th (células T CD4+), que produzem linfocinas que são fatores "auxiliares" na maturação de células B em células plasmáticas secretoras de anticorpos. As células Th também produzem certas linfocinas

5 que estimulam a diferenciação de linfócitos T efetores e a atividade de macrófagos. As células Th1 reconhecem antígeno em macrófagos em associação com MHC da Classe II e se tornam ativadas (por IL-1), para a produção de linfocinas, incluindo o IFN- γ que ativa macrófagos e células NK. Essas

10 células medeiam vários aspectos da resposta da imunidade mediada por células, incluindo reações de hipersensibilidade do tipo retardada. As células Th2 reconhecem antígeno em associação com MHC da Classe II em uma célula de apresentação de antígeno ou APC (por exemplo,

15 macrófagos migratórios e células dendríticas), e depois produzem interleucinas e outras substâncias que estimulam a proliferação e a atividade específicas de células B e de células T.

Além de servirem como APCs que iniciam interações,

20 desenvolvimento e proliferação de células T, os macrófagos estão envolvidos na expressão da imunidade mediada por células, pois se tornam ativados por IFN- γ produzido em uma resposta imune mediada por células. Macrófagos ativados possuem um potencial fagocítico aumentado e liberam

25 substâncias solúveis que causam inflamação e destroem muitas bactérias e outras células. Células *natural killer* são células citotóxicas que lisam células que abrigam novos antígenos, independentemente do seu tipo de MHC, e lisam até mesmo algumas células que não abrigam proteínas MHC.

30 Células T *natural killer*, ou células NK, são definidas por

sua habilidade para matar células que exibem um antígeno estranho (por exemplo, células tumorais), independentemente do tipo de MHC, e independentemente de sensibilização (exposição) prévia ao antígeno. As células NK podem ser
5 ativadas por IL-2 e IFN- γ , e lisam células da mesma forma que os linfócitos T citotóxicos. Algumas células NK possuem receptores para o domínio Fc do anticorpo IgG (por exemplo, CD16 ou Fc γ RIII) e são, portanto, capazes de se ligar à porção Fc de IgG na superfície de uma célula-alvo e liberar
10 componentes citolíticos que matam a célula-alvo por meio de citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células.

Outro grupo de células é formado pelos granulócitos ou leucócitos polimorfonucleares (PMNs). Neutrófilos, um tipo
15 de PMN, matam invasores bacterianos e fagocitam seus restos. Os eosinófilos são outro tipo de PMN, e contêm grânulos que se mostram citotóxicos quando liberados sobre outra célula, por exemplo, uma célula estranha. Basófilos, um terceiro tipo de PMN, são mediadores significativos de
20 respostas fisiológicas poderosas (por exemplo, inflamação) que exercem seus efeitos por liberação de diversos compostos biologicamente ativos, por exemplo, histamina, serotonina, prostaglandinas e leucotrienos. Comum a todos esses tipos de células é a capacidade de exercer um efeito
25 fisiológico dentro de um organismo, freqüentemente por morte e, opcionalmente, remoção, de composições deletérias como, por exemplo, células estranhas.

Embora diversas células mamíferas, incluindo células do sistema imunológico, sejam capazes de exercer
30 diretamente um efeito fisiológico (por exemplo, morte da

célula, tipificada por Tc, NK, alguns PMNs, macrófagos, e semelhantes), outras células contribuem indiretamente para um efeito fisiológico. Por exemplo, a apresentação inicial de um antígeno a uma célula T virgem (*naïve*) do sistema imunológico exige a apresentação de MHC que comanda o contato célula-célula. Além disso, freqüentemente há necessidade de um contato entre uma célula T ativada e uma célula B antígeno-específica para que se obtenha uma resposta imunogênica em particular. Uma terceira forma de contato célula-célula freqüentemente observada em respostas imunes é o contato entre uma célula B ativada e células dendríticas foliculares. Cada uma dessas exigências de contato célula-célula complica o direcionamento de um agente ativo biologicamente a certo alvo.

Acredita-se que a citotoxicidade dependente de complemento (CDC) seja um mecanismo significativo para a depuração de células-alvo específicas como, por exemplo, células tumorais. CDC é uma série de eventos que consiste em uma coleção de enzimas que se tornam ativadas umas pelas outras em cascata. O complemento possui um papel importante na depuração de antígenos, obtida por suas quatro funções principais: (1) vasodilatação local; (2) atração de células imunes, especialmente fagócitos (quimiotaxia); (3) marcação de organismos estranhos para fagocitose (opsonização); e (4) destruição de organismos invasores pelo complexo de ataque à membrana (ataque MAC). A molécula central é a proteína C3. Ela é uma enzima que é dividida em dois fragmentos por componentes da via clássica ou da via alternativa. A via clássica é induzida por anticorpos, especialmente IgG e IgM, enquanto a via alternativa é

estimulada de forma inespecífica por produtos bacterianos como, por exemplo, lipopolissacarídeos (LPS). Resumidamente, os produtos da divisão de C3 incluem um pequeno peptídeo C3a que é quimiotático para células imunes fagocíticas e resulta em vasodilatação local ao causarem a 5 liberação do fragmento C5a por C5. A outra parte de C3, C3b, reveste antígenos na superfície de organismos estranhos e atua para opsonizar o organismo para destruição. C3b também reage com outros componentes do 10 sistema complemento para formar uma MAC que consiste em C5b, C6, C7, C8 e C9.

Há problemas associados ao uso de anticorpos em terapia humana, já que a resposta do sistema imunológico a qualquer antígeno, até mesmo o mais simples, é 15 "policlonal", ou seja, o sistema fabrica anticorpos de uma ampla gama de estruturas, tanto em suas regiões de ligação quanto em suas regiões efetoras.

Foram usadas duas abordagens em uma tentativa de reduzir o problema de anticorpos imunogênicos. A primeira é 20 produção de anticorpos quiméricos nos quais a parte de ligação de antígeno (regiões variáveis) de um anticorpo monoclonal de camundongo é fundida à parte efetora (região constante) de um anticorpo humano. Em uma segunda abordagem, foram alterados anticorpos por meio de uma 25 técnica conhecida como enxerto de região determinante de complementaridade (CDR) ou "humanização". Esse processo foi ainda aprimorado para incluir alterações, sendo denominado "remodelagem" ("reshaping") (Verhoeven, e cols., 1988 *Science* 239: 1.534-1.536; Riechmann, e cols., 1988 *Nature* 332: 323-337; Tempest, e cols., *Bio/Technol.* 1991 9: 266-

271), "hiper-quimerização" (Queen, e cols., 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10.029-10.033; Co, e cols., 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 2.869-2.873; Co, e cols., 1992 *J. Immunol.* 148: 1.149-1.154), e "veneering" (Mark, e cols., Em: Metcalf B.W., Dalton B.J., eds. "Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential". Nova York: Plenum Press, 1994: 291-312).

Uma média de menos de um anticorpo terapêutico por ano foi introduzida no mercado, começando em 1986, onze anos após a publicação de anticorpos monoclonais. Foram introduzidos cinco anticorpos monoclonais murídeos em medicina humana ao longo de um período de dez anos, de 1986 a 1995, incluindo "muromonab-CD3" (OrthoClone OKT3®) para rejeição aguda de transplantes de órgãos; "edrecolomab" (Panorex®) para câncer cólon-retal; "odulimomab" (Antilfa®) para rejeição de transplantes; e "ibritumomab" (Zevalin® yiuxetan) para linfoma não Hodgkin. Adicionalmente, um Fab monoclonal, "abciximab" (ReoPro®), foi comercializado para a prevenção de re-oclusão da artéria coronária. Três anticorpos monoclonais quiméricos também foram lançados: "rituximab" (Rituxan®), para o tratamento de linfomas de células B; "basiliximab" (Simulect®), para rejeição de transplantes; e "infliximab" (Remicade®), para o tratamento de artrite reumatóide e doença de Crohn. Adicionalmente, "abciximab" (ReoPro®), um fragmento Fab de 47,6 kD de um anticorpo monoclonal quimérico humano-murídeo, é comercializado como um auxiliar na intervenção coronária percutânea para a prevenção de complicações cardíacas isquêmicas em pacientes submetidos a intervenção coronária percutânea. Finalmente, foram lançados sete "anticorpos

monoclonais humanizados". "Daclizumab" (Zenapax®) é usado para evitar a rejeição aguda de rins transplantados; "palivizumab" (Synagis®) para RSV; "trastuzumab" (Herceptin®) se liga a HER-2, um receptor de fator de crescimento encontrado em células de cânceres e mama; 5 "gemtuzumab" (Mylotarg®) para leucemia mielógena aguda (AML); e "alemtuzumab" (MabCampath®) para leucemia linfocítica crônica; "adalimumab" (Humira® (D2E7)) para o tratamento de artrite reumatóide; e "omalizumab" (Xolair®) 10 para o tratamento de asma persistente.

Dessa forma, várias tecnologias de anticorpos receberam atenção no esforço de desenvolver e comercializar substâncias terapêuticas e paliativos eficazes. Infelizmente, problemas continuam a comprometer a promessa 15 de cada uma dessas terapias. Por exemplo, a maioria dos pacientes com câncer tratados com rituximab apresenta recidiva, geralmente em até cerca de 6-12 meses, e foram relatadas reações fatais à infusão em até 24 horas após a infusão de rituximab. Insuficiência renal aguda 20 necessitando de diálise com casos de resultado fatal também foi relatada em tratamentos com rituximab, bem como reações mucocutâneas graves, ocasionalmente fatais. Adicionalmente, são necessárias doses elevadas de rituximab para injeção intravenosa, pois a molécula é grande, de aproximadamente 25 150 kDa, e a difusão nos tecidos linfóides, onde muitas células tumorais podem residir, é limitada.

A administração de trastuzumab pode resultar no desenvolvimento de disfunção ventricular, insuficiência cardíaca congestiva, e reações de hipersensibilidade graves 30 (incluindo anafilaxia), reações à infusão e eventos

pulmonares. A terapia imunossupressora com daclizumab está associada a um risco aumentado para o desenvolvimento de distúrbios linfoproliferativos e infecções oportunistas. A morte por insuficiência hepática, que surge em
5 decorrência da grave hepatotoxicidade e de doença veno-oclusiva (VOD), foi relatada em pacientes que receberam gentuzumab.

A hepatotoxicidade também foi relatada em pacientes que recebem alemtuzumab. Ocorreram casos de
10 pancitopenia/hipoplasia da medula, trombocitopenia autoimune idiopática e anemia hemolítica autoimune sérios e, em alguns casos, raros, fatais, em pacientes que recebem a terapia com alemtuzumab. Alemtuzumab também pode causar reações sérias à infusão, além de infecções oportunistas.
15 Em pacientes tratados com adalimumab, foram relatadas infecções sérias e sépsis, incluindo casos fatais, bem como a exacerbação de sintomas clínicos e/ou evidências radiográficas de doenças desmielinizantes, e pacientes tratados com adalimumab em experimentos clínicos
20 apresentaram uma incidência maior de linfoma do que a taxa esperada na população geral. Omalizumab supostamente induz malignidades e anafilaxia.

O câncer inclui uma ampla gama de doenças, que afetam aproximadamente um em quatro indivíduos em todo o mundo. A
25 proliferação rápida e desregulada de células malignas é a característica fundamental de muitos tipos de câncer, incluindo malignidades hematológicas. Embora os pacientes com uma condição maligna hematológica tenham se beneficiado dos avanços na terapia do câncer nas últimas duas décadas
30 (Multani e cols., 1998 *J. Clin. Oncology* 16: 3.691-3.710) e

os tempos de remissão tenham aumentado, a maioria dos pacientes ainda apresenta recidivas e sucumbe à sua doença. Barreiras à cura com fármacos citotóxicos incluem, por exemplo, resistência da célula tumoral e a alta toxicidade da quimioterapia, o que evita uma dosagem ótima em muitos

5 pacientes.

Foi relatado que o tratamento de pacientes com linfoma de células B de grau baixo ou folicular com o uso de um anticorpo monoclonal quimérico CD20 induz respostas

10 parciais ou completas nos pacientes (McLaughlin e cols., 1996 *Blood* 88:90a (resumo, supl. 1); Maloney e cols., 1997 *Blood* 90: 2.188-95). No entanto, como observado acima, a recidiva do tumor comumente ocorre em até seis meses a um ano. São necessários avanços adicionais na soroterapia para

15 induzir respostas mais duráveis, por exemplo, no linfoma de células B de grau baixo, e para permitir um tratamento eficaz de linfoma de grau elevado e de outras doenças de células B.

Outra abordagem tem sido o direcionamento de

20 radioisótopos aos linfomas de células B com o uso de anticorpos monoclonais específicos para CD20. Embora a eficácia da terapia seja supostamente aumentada, a toxicidade associada decorrente da meia-vida *in vivo* longa do anticorpo radioativo aumenta, algumas vezes exigindo que

25 o paciente seja submetido ao resgate de células-tronco (Press e cols., 1993 *N. Eng. J. Med.* 329: 1.219-1.224; Kaminski e cols., 1993 *N. Eng. J. Med.* 329: 459-65). Anticorpos monoclonais para CD20 também foram clivados com proteases para a geração de fragmentos $F(ab')_2$ ou Fab,

30 antes da adesão do radioisótopo. Há relatos de que isso

aumenta a penetração do conjugado de radioisótopo no tumor e encurta a meia-vida *in vivo*, reduzindo, dessa forma, a toxicidade para os tecidos normais. No entanto, essas moléculas não possuem funções efetoras, que incluem fixação
5 de complemento e/ou ADCC.

Doenças autoimunes incluem doenças tireoidianas autoimunes, que incluem doença de Graves e tireoidite de Hashimoto. Somente nos Estados Unidos, há cerca de 20 milhões de pessoas que possuem alguma forma de doença
10 tireoidiana autoimune. A doença tireoidiana autoimune decorre da produção de auto-anticorpos que estimulam a tireóide, causando hipertireoidismo (doença de Graves), ou destroem a tireóide, causando hipotireoidismo (tireoidite de Hashimoto). A estimulação da tireóide é causada por
15 auto-anticorpos que se ligam e ativam a tireóide, estimulando o receptor de hormônio (TSH). A destruição da tireóide é causada por auto-anticorpos que reagem com outros antígenos da tireóide. O tratamento atual para a
doença de Graves inclui cirurgia, terapia com iodo
20 radioativo ou fármaco antitireoidiano. O iodo radioativo é amplamente usado, uma vez que as medicações antitireoidianas possuem efeitos colaterais significativos e a recorrência da doença é elevada. A cirurgia é reservada
para pacientes com grandes bóci os ou quando há necessidade
25 de uma normalização muito rápida da função tireoidiana. Não há tratamentos direcionados à produção de auto-anticorpos responsáveis pela estimulação do receptor de TSH. O
tratamento atual para a tireoidite de Hashimoto é levotiroxina sódica, e provavelmente o tratamento é feito
30 por toda a vida, por causa da baixa probabilidade de

remissão. A terapia supressiva demonstrou que diminui os bólios na tireoidite de Hashimoto, mas não são conhecidas terapias que reduzam a produção de auto-anticorpos para atacar o mecanismo da doença.

5 A artrite reumatóide (RA) é uma doença crônica caracterizada por inflamação das articulações, que causa edema, dor e perda de função. Estima-se que a RA afete 2,5 milhões de pessoas nos Estados Unidos. A RA é causada por uma combinação de eventos, que incluem uma infecção ou
10 lesão inicial, uma resposta imune anormal e fatores genéticos. Embora células T e células B auto-reativas estejam presentes na RA, a detecção de níveis elevados de um anticorpo que se acumula nas articulações, denominado fator reumatóide, é usada no diagnóstico de RA. O
15 tratamento atual pra RA inclui muitas medicações para reduzir da dor e tornar mais lenta a progressão da doença. Não foi encontrada nenhuma terapia que possa curar a doença. As medicações incluem fármacos antiinflamatórios não esteróides (NSAIDS) e fármacos anti-reumáticos
20 modificadores da doença (DMARDS). NSAIDS são úteis na doença benigna, mas não conseguem evitar a progressão até a destruição da articulação e debilidade na RA grave. Tanto NSAIDS quanto DMARDS estão associados a efeitos colaterais significativos. Apenas um novo DMARD, Leflunomida, foi
25 aprovado em mais de 10 anos. A Leflunomida bloqueia a produção de auto-anticorpos, reduz a inflamação e torna mais lenta a progressão da RA. No entanto, esse fármaco também causa efeitos colaterais graves que incluem náuseas, diarreia, perda de cabelo, erupções e lesão hepática.

30 O Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) é uma doença

autoimune causada por lesões recorrentes dos vasos sangüíneos em vários órgãos, que incluem os rins, a pele e as articulações. Estima-se que o SLE afete mais de 500.000 pessoas nos Estados Unidos. Em pacientes com SLE, uma
5 interação defeituosa entre células T e células B causa a produção de auto-anticorpos que atacam o núcleo das células. Esses incluem anticorpos anti-DNA de fita dupla e anti-Sm. Auto-anticorpos que se ligam aos fosfolipídeos também são encontrados em aproximadamente metade dos
10 pacientes com SLE, e são responsáveis pela lesão dos vasos sangüíneos e contagens sangüíneas baixas. Complexos imunes se acumulam nos rins, vasos sangüíneos e articulações de pacientes com SLE, onde causam inflamação e lesão tecidual. Nenhum tratamento para o SLE comprovadamente cura a doença.
15 NSAIDS e DMARDS são usados para o tratamento, dependendo da gravidade da doença. A plasmaferese com troca de plasma para a remoção de auto-anticorpos pode causar a melhora temporária em pacientes com SLE. Há uma concordância geral de que os auto-anticorpos são responsáveis pelo SLE e,
20 portanto, novas terapias que eliminem a linhagem de células B, permitindo que o sistema imunológico seja reinicializado à medida que novas células B são geradas a partir de precursores, dariam esperança de um benefício duradouro em pacientes com SLE.
25 A síndrome de Sjögren é uma doença autoimune caracterizada por destruição das glândulas produtoras de umidade do corpo. A síndrome de Sjögren é um dos distúrbios autoimunes mais prevalentes, estimando-se que atinja até 4 milhões de pessoas nos Estados Unidos. Aproximadamente
30 metade das pessoas que sofrem com a síndrome de Sjögren

também tem uma doença do tecido conjuntivo, por exemplo, RA, enquanto a outra metade possui síndrome de Sjögren primária, sem outra doença autoimune concomitante. Auto-anticorpos, incluindo anticorpos antinucleares, fator reumatóide, anti-fodrina e anti-receptor muscarínico estão
5 freqüentemente presentes em pacientes com síndrome de Sjögren. O tratamento convencional inclui corticosteróides, e terapias adicionais mais eficazes seriam benéficas.

A púrpura trombocitopênica imune (ITP) é causada por
10 auto-anticorpos que se ligam às plaquetas sangüíneas e causam sua destruição. Alguns casos de ITP são causados por fármacos, e outros estão associados à infecção, gravidez ou doença autoimune como, por exemplo, SLE. Aproximadamente metade de todos os casos é classificada como sendo de
15 origem idiopática. O tratamento de ITP é determinado pela gravidade dos sintomas. Em alguns casos, não é necessário tratamento, embora na maioria dos casos sejam usados fármacos imunossupressores, incluindo corticosteróides ou infusões intravenosas de imunoglobulina para a eliminação
20 de células T. Outro tratamento que normalmente resulta em um número aumentado de plaquetas é a remoção do baço, o órgão que destrói plaquetas cobertas com anticorpos. Fármacos imunossupressores mais potentes, incluindo ciclosporina, ciclofosfamida ou azatioprina, são usados
25 para pacientes com casos graves. A remoção de auto-anticorpos por passagem do plasma dos pacientes sobre uma coluna de Proteína A é usada como tratamento de segunda linha em pacientes com doença grave. São necessárias terapias adicionais mais eficazes.

30 A esclerose múltipla (MS) também é uma doença

autoimune. Ela é caracterizada por inflamação do sistema nervoso central e destruição de mielina, que isola as fibras das células nervosas no cérebro, medula vertebral e no corpo. Embora a causa da MS seja desconhecida, é
5 amplamente aceito que células T autoimunes sejam contribuintes primários para a patogênese da doença. No entanto, níveis elevados de anticorpos estão presentes no líquido cefalorraquidiano de pacientes com MS, e alguns prevêm que a resposta de células B que leva à produção de
10 anticorpos seja importante para a mediação da doença. Não foi estudada nenhuma terapia de eliminação de células B em pacientes com MS, e não há cura para MS. O tratamento atual consiste em corticosteróides, que podem reduzir a duração e a gravidade dos ataques, mas não afetam a evolução da MS ao
15 longo do tempo. Foi aprovada recentemente uma nova biotecnologia para terapias com interferon (IFN) para a MS, mas são necessárias terapias adicionais mais eficazes.

A miastenia gravis (MG) é um distúrbio neuromuscular autoimune crônico que é caracterizado por fraqueza dos
20 grupos musculares voluntários. MG afeta cerca de 40.000 pessoas nos Estados Unidos. A MG é causada por auto-anticorpos que se ligam aos receptores de acetilcolina expressos nas junções neuromusculares. Os auto-anticorpos reduzem ou bloqueiam os receptores de acetilcolina,
25 evitando a transmissão de sinais dos nervos para os músculos. Não há cura para a MG. Os tratamentos comuns incluem imunossupressão com corticosteróides, ciclosporina, ciclofosfamida ou azatioprina. A remoção cirúrgica do timo é usada freqüentemente para embotar a resposta autoimune. A
30 plasmaferese, usada para reduzir os níveis de auto-

anticorpos no sangue, é eficaz na MG, mas possui curta duração, na medida em que a produção de auto-anticorpos continua. A Plasmaferese é normalmente reservada para fraqueza muscular grave, antes da cirurgia. Seriam
5 benéficas terapias novas e eficazes.

A psoríase afeta aproximadamente cinco milhões de pessoas, e é caracterizada por inflamação autoimune na pele. A psoríase também está associada à artrite em 30% (artrite psoriática). Muitos tratamentos foram usados,
10 incluindo esteróides, retinóides com luz UV, derivados da vitamina D, ciclosporina e metotrexato, mas fica evidente que a psoríase seria beneficiada por terapias novas e eficazes. A esclerodermia é uma doença autoimune crônica do tecido conjuntivo que também é conhecida como esclerose
15 sistêmica. A esclerodermia é caracterizada por uma superprodução de colágeno, causando um espessamento da pele, e aproximadamente 300.000 pessoas nos Estados Unidos possuem esclerodermia, que também seria beneficiada por terapias novas e eficazes.

20 Fica evidente a partir da discussão apresentada anteriormente a necessidade de composições e métodos aprimorados para tratar, atenuar ou evitar diversas doenças, distúrbios e condições, incluindo câncer e doenças autoimunes.

25

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção satisfaz pelo menos uma das necessidades mencionadas anteriormente na técnica pelo fornecimento de proteínas que contêm pelo menos dois domínios de ligação específicos, em que aqueles dois domínios estão ligados por
30 uma sub-região constante derivada de uma molécula de

anticorpo anexada em seu terminal C a um ligante aqui denominado um ligante *scorpion*, e ácidos nucleicos que codificam essas proteínas, além da produção, usos diagnósticos e terapêuticos de tais proteínas e ácidos nucleicos. A sub-região constante compreende um domínio derivado de um domínio C_{H2} de imunoglobulina e, de preferência, um domínio derivado de um domínio C_{H3} de imunoglobulina, mas não contém um domínio ou região derivada de, ou que corresponde a, um domínio C_{H1} de imunoglobulina. Previamente, acreditava-se que a colocação de uma região constante derivada de um anticorpo no interior de uma proteína interferiria com a função do anticorpo, por exemplo, com a função efetora, por analogia com a colocação convencional de regiões constantes de anticorpos nos terminais carboxi de cadeias de anticorpos. Além disso, a colocação de um ligante *scorpion*, que pode ser um peptídeo semelhante à dobradiça de imunoglobulina (dobradiça-like), no terminal C a uma sub-região constante é uma organização que difere da organização de imunoglobulinas de ocorrência natural. A colocação de uma sub-região constante (com um ligante *scorpion* anexado no terminal C da região constante) no interior de uma cadeia de polipeptídeos ou proteínas de acordo com a invenção, no entanto, resultou em proteínas que exibem função efetora e capacidades de ligação multivalente (mono- ou multiespecífica) relativamente desimpedidas por impedimentos estéricos. Como ficará evidente para aqueles habilitados na técnica considerando-se a presente apresentação, essas proteínas possuem um design modular e podem ser construídas por seleção de qualquer um entre

diversos domínios de ligação para o domínio de ligação 1 ou domínio de ligação 2 (ou para quaisquer domínios de ligação adicionais encontrados em uma proteína em particular de acordo com a invenção), por seleção de uma sub-região
5 constante que possui função efetora e por seleção de um ligante *scorpion*, semelhante ou não à dobradiça (por exemplo, peptídeos da região peduncular do receptor de lectina C do tipo II), com a proteína exibindo uma organização geral do domínio de ligação 1-N-sub-região
10 constante-ligante *scorpion*-domínio de ligação 2-C. Aqueles habilitados na técnica observarão ainda que proteínas com uma estrutura desse tipo, e os ácidos nucleicos que codificam essas proteínas, terão uma ampla variedade de aplicações, incluindo aplicações médicas e veterinárias.

15 Um aspecto da invenção é dirigido a uma proteína de ligação multivalente de cadeia simples com função efetora, ou *scorpion* (os termos são aqui utilizados de forma intercambiável), que compreende um primeiro domínio de ligação derivado de uma imunoglobulina (por exemplo, um
20 anticorpo) ou uma molécula imunoglobulina-like, uma sub-região constante que fornece uma função efetora, uma sub-região constante localizada no terminal C em relação ao primeiro domínio de ligação; um ligante *scorpion* localizado no terminal C em relação à sub-região constante; e um
25 segundo domínio de ligação derivado de uma imunoglobulina (por exemplo, um anticorpo) ou molécula imunoglobulina-like, localizado no terminal C em relação à sub-região constante; localizando, dessa forma, a sub-região constante entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de
30 ligação. A proteína de ligação de cadeia simples pode ser

multiespecífica, por exemplo, biespecífica, na medida em que se ligaria a dois ou mais alvos distintos, ou ela pode ser monoespecífica, com dois sítios de ligação para o mesmo alvo. Além disso, todos os domínios da proteína são encontrados em uma única cadeia, mas a proteína pode formar homo-multímeros, por exemplo, por formação de ligação dissulfeto intercadeias. Em algumas modalidades, o primeiro domínio de ligação e/ou o segundo domínio de ligação é/são derivado(s) de regiões variáveis de cadeias leves e pesadas de imunoglobulina, da mesma imunoglobulina ou de imunoglobulinas diferentes (por exemplo, anticorpos). A(s) imunoglobulina(s) pode ser de qualquer vertebrado, por exemplo, um mamífero, incluindo um ser humano, e pode ser quimérica, humanizada, fragmentos, variantes ou derivados de imunoglobulinas de ocorrência natural.

A invenção contempla proteínas nas quais o primeiro e o segundo domínios de ligação são derivados da mesma imunoglobulina ou de imunoglobulinas diferentes (por exemplo, anticorpos), e nas quais o primeiro e o segundo domínios de ligação reconhecem o mesmo alvo molecular ou alvos moleculares diferentes (por exemplo, marcadores da superfície celular, por exemplo, proteínas ligadas à membrana). Além disso, o primeiro e o segundo domínios de ligação podem reconhecer o mesmo epitopo ou epitopos diferentes. O primeiro e o segundo alvos moleculares podem estar associados à primeira e à segunda células-alvo, vírus, veículos e/ou objetos. Em modalidades preferidas de acordo com esse aspecto da invenção, cada primeiro domínio de ligação, segundo domínio de ligação e sub-região constante é derivado de uma imunoglobulina humana, por

exemplo, um anticorpo IgG. Ainda em outras modalidades, a proteína de ligação multivalente com função efetora possui pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação que reconhece pelo menos um alvo molecular sem células, por exemplo, uma proteína não associada a uma célula, por exemplo, uma proteína depositada ou uma proteína solúvel. Alvos moleculares sem células incluem, por exemplo, proteínas que nunca estiveram associadas a uma célula, por exemplo, compostos administrados como, por exemplo, proteínas, além de proteínas que são secretadas, clivadas, presentes em exossomos, ou de algum outro modo descarregadas ou separadas de uma célula.

As moléculas-alvo reconhecidas pelos primeiros e segundos domínios de ligação podem ser encontradas em, ou em associação com, células procarióticas, células eucarióticas, vírus (incluindo bacteriófago), veículos orgânicos ou inorgânicos de moléculas-alvo, e objetos estranhos iguais ou diferentes. Além disso, essas moléculas-alvo podem estar em células, vírus, veículos ou objetos fisicamente distintos do mesmo tipo (por exemplo, duas células eucarióticas, células procarióticas, vírus ou veículos distintos), ou essas moléculas-alvo podem estar em células, vírus, veículos ou objetos que diferem no tipo (por exemplo, uma célula eucariótica e um vírus). Células-alvo são aquelas células associadas a uma molécula-alvo reconhecida por um domínio de ligação, e incluem células endógenas ou autólogas, além de células exógenas ou estranhas (por exemplo, células microbianas infecciosas, células mamíferas transplantadas, incluindo células

sangüíneas transfundidas). A invenção compreende alvos para o primeiro e/ou o segundo domínios de ligação que sejam encontrados na superfície de uma(s) célula(s)-alvo associada(s) a uma doença, distúrbio ou condição de um

5 mamífero, por exemplo, um ser humano. Células-alvo exemplares incluem uma célula cancerígena, uma célula associada a uma doença ou distúrbio autoimune, e uma célula infecciosa (por exemplo, uma bactéria infecciosa). Uma célula de um organismo infeccioso, por exemplo, um parasita

10 de mamífero, também é contemplada como uma célula-alvo. Em algumas modalidades, uma proteína da invenção é a proteína de ligação multivalente (por exemplo, multiespecífica) com função efetora, em que pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhece

15 um alvo selecionado do grupo que consiste em um antígeno tumoral, um alvo de célula B, um membro da superfamília dos receptores de TNF, um membro da família Hedgehog, uma tirosina quinase receptora, uma molécula relacionada ao proteoglicano, um membro da superfamília TGF-beta, uma

20 molécula relacionada a Wnt, um ligante de receptor, um alvo de célula T, um alvo de célula dendrítica, um alvo de célula NK, um alvo celular de monócito/macrófago e um alvo de angiogênese.

Em algumas modalidades da proteína descrita acima, o

25 antígeno tumoral é selecionado do grupo que consiste em antígeno 1 do carcinoma de células escamosas (SCCA-1), (proteína T4-A), antígeno 2 do carcinoma de células escamosas (SCCA-2), antígeno do carcinoma ovariano CA125 (1A1-3B) (KIAA0049), mucina 1 (mucina associada a tumor),

30 (mucina associada ao carcinoma), (mucina epitelial

polimórfica), (PEM), (PEMT), (EPISIALINA), (antígeno da
 membrana epitelial associado a tumor), (EMA), (H23AG),
 (mucina urinária reativa ao amendoim), (PUM), (antígeno DF3
 associado ao carcinoma de mama), antígeno tumoral CTCL se1-
 5 1, antígeno tumoral CTCL se14-3, antígeno tumoral CTCL
 se20-4, antígeno tumoral CTCL se20-9, antígeno tumoral CTCL
 se33-1, antígeno tumoral CTCL se37-2, antígeno tumoral CTCL
 se57-1, antígeno tumoral CTCL se89-1, antígeno da membrana
 específico da próstata, glicoproteína oncofetal do
 10 trofoblasto 5T4, herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi
 Orf73, MAGE-C1 (antígeno de câncer/testículo CT7), antígeno
 MAGE-B1 (antígeno MAGE-XP) (DAM 10), antígeno MAGE-B2
 (DAM6), antígeno MAGE-2, antígeno MAGE-4a, antígeno MAGE-
 4b, antígeno do câncer de cólon NY-CO-45, antígeno do
 15 câncer de pulmão NY-LU-12 variante A, antígeno de
 superfície associado ao câncer, antígeno do adenocarcinoma
 ART1, antígeno paraneoplásico associado ao câncer cerebral-
 testicular (antígeno onconeuronal MA2; antígeno neuronal
 paraneoplásico), antígeno ventral neuro-oncológico 2
 20 (NOVA2), gene do antígeno do carcinoma hepatocelular 520,
 antígeno tumor-associado CO-029, antígeno tumor-associado
 MAGE-X2, sarcoma sinovial, X breakpoint 2, antígeno do
 carcinoma de células escamosas reconhecido por célula T,
 antígeno do câncer de cólon definido sorologicamente 1,
 25 antígeno do câncer de mama definido sorologicamente NY-BR-
 15, antígeno do câncer de mama definido sorologicamente NY-
 BR-16, cromogranina A; proteína secretora da paratireóide
 1, DUPAN-2, CA 19-9, CA 72-4, CA 195 e L6.

Modalidades do método descrito acima compreendem um
 30 alvo de célula B selecionado do grupo que consiste em CD10,

CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD38, CD39, CD40, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD78, CD79a/b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD89, CD98, CD126, CD127, CDw130, CD138 e CDw150.

5 Em outras modalidades do método descrito acima, o membro da superfamília dos receptores de TNF é selecionado do grupo que consiste em 4-1BB/TNFRSF9, NGF R/TNFRSF16, BAFF R/TNFRSF13C, osteoprotegerina/TNFRSF11B, BCMA/TNFRSF17, OX40/TNFRSF4, CD27/TNFRSF7, RANK/TNFRSF11A, 10 CD30/TNFRSF8, RELT/TNFRSF19L, CD40/TNFRSF5, TACI/TNFRSF13B, DcR3/TNFRSF6B, TNF RI/TNFRSF1A, DcTRAIL R1/TNFRSF23, TNF R1/TNFRSF1B, DcTRAIL R2/TNFRSF22, TRAIL R1/TNFRSF10A, DR3/TNFRSF25, TRAIL R2/TNFRSF10B, DR6/TNFRSF21, TRAIL R3/TNFRSF10C, EDAR, TRAIL R4/TNFRSF10D, Fas/TNFRSF6, 15 TROY/TNFRSF19, GITR/TNFRSF18, TWEAK R/TNFRSF12, HVEM/TNFRSF14, XEDAR, linfotoxina beta R/TNFRSF3, ligante de 4-1BB/TNFRSF9, linfotoxina, APRIL/TNFRSF13, linfotoxina beta/TNFRSF3, BAFF/TNFRSF13C, ligante de OX40/TNFRSF4, ligante de CD27/TNFRSF7, TL1A/TNFRSF15, ligante de CD30/TNFRSF8, TNF- 20 alfa/TNFRSF1A, ligante de CD40/TNFRSF5, TNF-beta/TNFRSF1B, EDA-A2, TRAIL/TNFRSF10, ligante de Fas/TNFRSF6, TRANCE/TNFRSF11, ligante de GITR/TNFRSF18, TWEAK/TNFRSF12 e LIGHT/TNFRSF14.

O método descrito acima também inclui modalidades nas 25 quais o membro da família Hedgehog é selecionado do grupo que consiste em *Patched* e *Smoothened*. Ainda em outras modalidades, a molécula relacionada ao proteoglicano é selecionada do grupo que consiste em proteoglicanos e reguladores deste. Modalidades adicionais do método se 30 dirigem a processos nos quais a tirosina quinase receptora

é selecionada do grupo que consiste em Axl, FGF R4, Clq R1/CD93, FGF R5, DDR1, Flt-3, DDR2, HGF R, Dtk, IGF-I R, EGF R, IGF-II R, Eph, INSR, EphA1, Insulina R/CD220, EphA2, M-CSF R, EphA3, Mer, EphA4, MSP R/Ron, EphA5, MuSK, EphA6, PDGF R alfa, EphA7, PDGF R beta, EphA8, Ret, EphB1, ROR1, EphB2, ROR2, EphB3, SCF R/c-kit, EphB4, Tie-1, EphB6, Tie-2, ErbB2, TrkA, ErbB3, TrkB, ErbB4, TrkC, FGF R1, VEGF R1/Flt-1, FGF R2, VEGF R2/Flk-1, FGF R3 e VEGF R3/Flt-4.

Em outras modalidades do método, membro da superfamília do fator de transformação de crescimento (TGF)-beta é selecionado do grupo que consiste em Activina RIA/ALK-2, GFR alfa-1, Activina RIB/ALK-4, GFR alfa-2, Activina RIIA, GFR alfa-3, Activina RIIB, GFR alfa-4, ALK-1, MIS RH, ALK-7, Ret, BMPR-IA/ALK-3, TGF-beta RI/ALK-5, BMPR-IB/ALK-6, TGF-beta RH, BMPR-II, TGF-beta RHb, Endoglin/CD105 e TGF-beta RIII.

Ainda outras modalidades do método compreendem uma molécula relacionada a Wnt selecionada do grupo que consiste em Frizzled-1, Frizzled-8, Frizzled-2, Frizzled-9, Frizzled-3, sFRP-1, Frizzled-4, sFRP-2, Frizzled-5, sFRP-3, Frizzled-6, sFRP-4, Frizzled-7, MFRP, LRP 5, LRP 6, Wnt-1, Wnt-8a, Wnt-3a, Wnt-10b, Wnt-4, Wnt-11, Wnt-5a, Wnt-9a e Wnt-7a.

Em outras modalidades do método, o ligante de receptor é selecionado do grupo que consiste em ligante de 4-1BB/TNFSF9, linfotoxina, APRIL/TNFSF13, linfotoxina beta/TNFSF3, BAFF/TNFSF13C, ligante de OX40/TNFSF4, ligante de CD27/TNFSF7, TL1A/TNFSF15, ligante de CD30/TNFSF8, TNF-alfa/TNFSF1A, ligante de CD40/TNFSF5, TNF-beta/TNFSF1B, EDA-A2, TRAIL/TNFSF10, ligante de Fas/TNFSF6,

TRANCE/TNFSF11, ligante de GITR/TNFSF18, TWEAK/TNFSF12,
 LIGHT/TNFSF14, Anfiregulina, NRG1 isoforma GGF2,
 Betacelulina, NRG1 isoforma SMDF, EGF, NRG1-alfa/HRG1-alfa,
 Epigen, NRG1-beta 1/HRG1-beta 1, Epiregulina, TGF-alfa, HB-
 5 EGF, TMEFF1/Tomoregulina-1, Neuregulina-3, TMEFF2, IGF-I,
 IGF-II, Insulina, Activina A, Activina B, Activina AB,
 Activina C, BMP-2, BMP-7, BMP-3, BMP-8, BMP-3b/GDF-10, BMP-
 9, BMP-4, BMP-15, BMP-5, Decapentaplégico, BMP-6, GDF-1,
 GDF-8, GDF-3, GDF-9, GDF-5, GDF-11, GDF-6, GDF-15, GDF-7,
 10 Artemina, Neurturina, GDNF, Persefina, TGF-beta, TGF-beta
 2, TGF-beta 1, TGF-beta 3, LAP (TGF-beta 1), TGF-beta 5,
 TGF-beta Latente 1, TGF-beta Latente bpl, TGF-beta 1.2,
 Lefty, Nodal, MIS/AMH, FGF ácido, FGF-12, FGF básico, FGF-
 13, FGF-3, FGF-16, FGF-4, FGF-17, FGF-5, FGF-19, FGF-6,
 15 FGF-20, FGF-8, FGF-21, FGF-9, FGF-23, FGF-10, KGF/FGF-7,
 FGF-11, Neuropilina-1, PlGF, Neuropilina-2, PlGF-2, PDGF,
 PDGF-A, VEGF, PDGF-B, VEGF-B, PDGF-C, VEGF-C, PDGF-D, VEGF-
 D e PDGF-AB.

Ainda em outras modalidades, o alvo de célula T é
 20 selecionado do grupo que consiste em 2B4/SLAMF4, IL-2 R
 alfa, 4-1BB/TNFRSF9, IL-2 R beta, ALCAM, B7-1/CD80, IL-4 R,
 B7-H3, BLAME/SLAMF8, BTLA, IL-6 R, CCR3, IL-7 R alfa, CCR4,
 CXCR1/IL-8 RA, CCR5, CCR6, IL-10 R alfa, CCR7, IL-10 R
 beta, CCR8, IL-12 R beta 1, CCR9, IL-12 R beta 2, CD2, IL-
 25 13 R alfa 1, IL-13, CD3, CD4, ILT2/CD85j, ILT3/CD85k,
 ILT4/CD85d, ILT5/CD85a, Integrina alfa 4/CD49d, CD5,
 Integrina alfa E/CD103, CD6, Integrina alfa M/CD11b, CD8,
 Integrina alfa X/CD11c, Integrina beta 2/CD18, KIR/CD158,
 CD27/TNFRSF7, KIR2DL1, CD28, KIR2DL3, CD30/TNFRSF8,
 30 KIR2DL4/CD158d, CD31/PECAM-1, KIR2DS4, ligante de

CD40/TNFSF5, LAG-3, CD43, LAIR1, CD45, LAIR2, CD83, Leukotriene B4 R1, CD84/SLAMF5, NCAM-L1, CD94, NKG2A, CD97, NKG2C, CD229/SLAMF3, NKG2D, CD2F-10/SLAMF9, NT-4, CD69, NTB-A/SLAMF6, cadeia gama comum/IL-2 R gama, Osteopontina, 5 CRACC/SLAMF7, PD-1, CRTAM, PSGL-1, CTLA-4, RANK/TNFRSF11A, CX3CR1, CX3CL1, L-Selectina, CXCR3, SIRP beta 1, CXCR4, SLAM, CXCR6, TCCR/WSX-1, DNAM-1, Timopoietina, EMMPRIN/CD147, TIM-1, EphB6, TIM-2, Fas/TNFRSF6, TIM-3, ligante de Fas/TNFSF6, TIM-4, Fc gama RIII/CD16, TIM-6, 10 GITR/TNFRSF18, TNF RI/TNFRSF1A, Granulisina, TNF RII/TNFRSF1B, HVEM/TNFRSF14, TRAIL R1/TNFRSF10A, ICAM-1/CD54, TRAIL R2/TNFRSF10B, ICAM-2/CD102, TRAIL R3/TNFRSF10C, IFN-gama R1, TRAIL R4/TNFRSF10D, IFN-gama R2, TSLP, IL-1 RI e TSLP R.

15 Em outras modalidades, o receptor de célula NK é selecionado do grupo que consiste em 2B4/SLAMF4, KIR2DS4, CD155/PVR, KIR3DL1, CD94, LMIR1/CD300A, CD69, LMIR2/CD300c, CRACC/SLAMF7, LMIR3/CD300LF, DNAM-1, LMIR5/CD300LB, Fc épsilon RII, LMIR6/CD300LE, Fc gama RI/CD64, MICA, Fc gama 20 RIIB/CD32b, MICB, Fc gama RIIC/CD32c, MULT-1, Fc gama RIIA/CD32a, Nectina-2/CD112, Fc gama RIII/CD16, NKG2A, FcRH1/IRTA5, NKG2C, FcRH2/IRTA4, NKG2D, FcRH4/IRTA1, NKp30, FcRH5/IRTA2, NKp44, Receptor Fc-like 3/CD16-2, NKp46/NCR1, NKp80/KLRF1, NTB-A/SLAMF6, Rae-1, Rae-1 alfa, Rae-1 beta, 25 Rae-1 delta, H60, Rae-1 épsilon, ILT2/CD85j, Rae-1 gama, ILT3/CD85k, TREM-1, ILT4/CD85d, TREM-2, ILT5/CD85a, TREM-3, KIR/CD158, TREML1/TLT-1, KIR2DL1, ULBP-1, KIR2DL3, ULBP-2, KIR2DL4/CD158d e ULBP-3.

Em outras modalidades, o alvo celular de 30 monócito/macrófago é selecionado do grupo que consiste em

B7-1/CD80, ILT4/CD85d, B7-H1, ILT5/CD85a, cadeia beta
 comum, Integrina alfa 4/CD49d, BLAME/SLAMF8, Integrina alfa
 X/CD11c, CCL6/C10, Integrina beta 2/CD18, CD155/PVR,
 Integrina beta 3/CD61, CD31/PECAM-1, Latexina, CD36/SR-B3,
 5 Leucotrieno B4 R1, CD40/TNFRSF5, LIMP2/SR-B2, CD43,
 LMIR1/CD300A, CD45, LMIR2/CD300c, CD68, LMIR3/CD300LF,
 CD84/SLAMF5, LMIR5/CD300LB, CD97, LMIR6/CD300LE, CD163,
 LRP-1, CD2F-10/SLAMF9, MARCO, CRACC/SLAMF7, MD-1, ECF-L,
 MD-2, EMMPRIN/CD147, MGL2, Endoglin/CD105,
 10 Osteoactivina/GPNMB, Fc gama RI/CD64, Osteopontina, Fc gama
 RIIB/CD32b, PD-L2, Fc gama RIIC/CD32c, Siglec-3/CD33, Fc
 gama RIIA/CD32a, SIGNR1/CD209, Fc gama RIII/CD16, SLAM, GM-
 CSF R alfa, TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102, TLR3, IFN-gama R1,
 TLR4, IFN-gama R2, TREM-1, IL-1 RII, TREM-2, ILT2/CD85j,
 15 TREM-3, ILT3/CD85k, TREM1/TLT-1, 2B4/SLAMF4, IL-10 R alfa,
 ALCAM, IL-10 R beta, Aminopeptidase N/ANPEP, ILT2/CD85j,
 cadeia beta comum, ILT3/CD85k, C1q R1/CD93, ILT4/CD85d,
 CCR1, ILT5/CD85a, CCR2, Integrina alfa 4/CD49d, CCR5,
 Integrina alfa M/CD11b, CCR8, Integrina alfa X/CD11c,
 20 CD155/PVR, Integrina beta 2/CD18, CD14, Integrina beta
 3/CD61, CD36/SR-B3, LAIR1, CD43, LAIR2, CD45, Leucotrieno
 B4 R1, CD68, LIMP2/SR-B2, CD84/SLAMF5, LMIR1/CD300A, CD97,
 LMIR2/CD300c, CD163, LMIR3/CD300LF, fator da coagulação
 III/fator tecidual, LMIR5/CD300LB, CX3CR1, CX3CL1,
 25 LMIR6/CD300LE, CXCR4, LRP-1, CXCR6, M-CSF R, DEP-1/CD148,
 MD-1, DNAM-1, MD-2, EMMPRIN/CD147, MMR, Endoglin/CD105,
 NCAM-L1, Fc gama RI/CD64, PSGL-1, Fc gama RIII/CD16, RP105,
 G-CSF R, L-Selectina, GM-CSF R alfa, Siglec-3/CD33,
 HVEM/TNFRSF14, SLAM, ICAM-1/CD54, TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102,
 30 TREM-1, IL-6 R, TREM-2, CXCR1/IL-8 RA, TREM-3 e TREM1/TLT-

Ainda em outras modalidades do método, um alvo de célula dendrítica é selecionado do grupo que consiste em CD36/SR-B3, LOX-1/SR-E1, CD68, MARCO, CD163, SR-AI/MSR, CD5L, SREC-I, CL-P1/COLEC12, SREC-II, LIMP2/SR-B2, RP105, TLR4, TLR1, TLR5, TLR2, TLR6, TLR3, TLR9, ligante de 4-1BB/TNFSF9, IL-12/IL-23 p40, 4-Amino-1,8-naftalimida, ILT2/CD85j, CCL21/6CKine, ILT3/CD85k, 8-oxo-dG, ILT4/CD85d, 8D6A, ILT5/CD85a, A2B5, Integrina alfa 4/CD49d, Aag, Integrina beta 2/CD18, AMICA, Langerina, B7-2/CD86, Leucotrieno B4 R1, B7-H3, LMIR1/CD300A, BLAME/SLAMF8, LMIR2/CD300c, C1q R1/CD93, LMIR3/CD300LF, CCR6, LMIR5/CD300LB, CCR7, LMIR6/CD300LE, CD40/TNFRSF5, MAG/Siglec-4a, CD43, MCAM, CD45, MD-1, CD68, MD-2, CD83, MDL-1/CLEC5A, CD84/SLAMF5, MMR, CD97, NCAM-L1, CD2F-10/SLAMF9, Osteoactivina/GPNMB, Chem 23, PD-L2, CLEC-1, RP105, CLEC-2, Siglec-2/CD22, CRACC/SLAMF7, Siglec-3/CD33, DC-SIGN, Siglec-5, DC-SIGNR/CD299, Siglec-6, DCAR, Siglec-7, DCIR/CLEC4A, Siglec-9, DEC-205, Siglec-10, Dectina-1/CLEC7A, Siglec-F, Dectina-2/CLEC6A, SIGNR1/CD209, DEP-1/CD148, SIGNR4, DLEC, SLAM, EMMPRIN/CD147, TCCR/WSX-1, Fc gama RI/CD64, TLR3, Fc gama RIIB/CD32b, TREM-1, Fc gama RIIC/CD32c, TREM-2, Fc gama RIIA/CD32a, TREM-3, Fc gama RIII/CD16, TREML1/TLT-1, ICAM-2/CD102 e Vanilóide R1.

Ainda em outras modalidades do método, o alvo de angiogênese é selecionado do grupo que consiste em Angiopoietina-1, Angiopoietina-like 2, Angiopoietina-2, Angiopoietina-like 3, Angiopoietina-3, Angiopoietina-like 7/CDT6, Angiopoietina-4, Tie-1, Angiopoietina-like 1, Tie-2, Angiogenina, iNOS, fator da coagulação III/fator

tecidual, nNOS, CTGF/CCN2, NOV/CCN3, DANCE, OSM, EDG-1,
 Plfr, EG-VEGF/PK1, Proliferina, Endostatina, ROB04,
 Eritropoietina, Trombospondina-1, Cininostatina,
 Trombospondina-2, MFG-E8, Trombospondina-4, Óxido nítrico,
 5 VG5Q, eNOS, EphA1, EphA5, EphA2, EphA6, EphA3, EphA7,
 EphA4, EphA8, EphB1, EphB4, EphB2, EphB6, EphB3, Efrina-A1,
 Efrina-A4, Efrina-A2, Efrina-A5, Efrina-A3, Efrina-B1,
 Efrina-B3, Efrina-B2, FGF ácido, FGF-12, FGF básico, FGF-
 13, FGF-3, FGF-16, FGF-4, FGF-17, FGF-5, FGF-19, FGF-6,
 10 FGF-20, FGF-8, FGF-21, FGF-9, FGF-23, FGF-10, KGF/FGF-7,
 FGF-11, FGF R1, FGF R4, FGF R2, FGF R5, FGF R3,
 Neuropilina-1, Neuropilina-2, Semaforina 3A, Semaforina 6B,
 Semaforina 3C, Semaforina 6C, Semaforina 3E, Semaforina 6D,
 Semaforina 6A, Semaforina 7A, MMP, MMP-11, MMP-1, MMP-12,
 15 MMP-2, MMP-13, MMP-3, MMP-14, MMP-7, MMP-15, MMP-8, MMP-
 16/MT3-MMP, MMP-9, MMP-24/MT5-MMP, MMP-10, MMP-25/MT6-MMP,
 TIMP-1, TIMP-3, TIMP-2, TIMP-4, ACE, IL-13 R alfa 1, IL-13,
 C1q R1/CD93, Integrina alfa 4/CD49d, VE-Caderina, Integrina
 beta 2/CD18, CD31/PECAM-1, KLF4, CD36/SR-B3, LYVE-1, CD151,
 20 MCAM, CL-P1/COLEC12, Nectina-2/CD112, fator da coagulação
 III/fator tecidual, E-Selectina, D6, P-Selectina, DC-
 SIGNR/CD299, SLAM, EMMPRIN/CD147, Tie-2, Endogлина/CD105,
 TNF RI/TNFRSF1A, EPCR, TNF R1/TNFRSF1B, Eritropoietina R,
 TRAIL R1/TNFRSF10A, ESAM, TRAIL R2/TNFRSF10B, FABP5, VCAM-
 25 1, ICAM-1/CD54, VEGF R2/Flk-1, ICAM-2/CD102, VEGF R3/Flt-4,
 IL-1 RI e VG5Q.

Outras modalidades do método fornecem proteínas de
 ligação multivalentes nas quais pelo menos um entre o
 domínio de ligação 1 e o domínio de ligação 2 se liga
 30 especificamente a um alvo selecionado do grupo que consiste

em antígeno da membrana específico para a próstata (folato hidrolase 1), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE, também conhecido como receptor de produtos finais de glicosilação avançada ou AGER), IL-17 A, IL-17 F, P19 (IL23A e IL12B), Dickkopf-1 (Dkk1), NOTCH 1, NG2 (sulfato de condroitina proteoglicano 4 ou CSPG4), IgE (IgHE ou IgH2), IL-22R (IL22RA1), IL-21, oligômeros de amilóide β (oligômeros Ab), proteína precursora do amilóide β (APP), Receptor NOGO (RTN4R), Proteína 5 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP5), IL-4, miostatina (GDF8), antígeno very late 4, um alfa 4, integrina beta 1 (VLA4 ou ITGA4), um alfa 4, integrina beta 7 encontrada em leucócitos e IGF-1R. Por exemplo, um alvo de VLA4 pode ser reconhecido por uma proteína de ligação multivalente na qual pelo menos um entre o domínio de ligação 1 e o domínio de ligação 2 é um domínio de ligação derivado de Natalizumab (Antegren).

Em algumas modalidades, a célula cancerígena é uma célula hematopoiética, transformada ou cancerígena. Em algumas dessas modalidades, pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhece um alvo selecionado do grupo que consiste em um alvo de célula B, um alvo de monócito/macrófago, um alvo de célula dendrítica, um alvo de célula NK e um alvo de célula T, cada um como aqui definido. Além disso, pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação pode reconhecer um alvo mielóide, incluindo, sem limitação, CD5, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27, CD29, CD30, CD31,

CD33, CD34, CD35, CD38, CD43, CD45, CD64, CD66, CD68, CD70,
 CD80, CD86, CD87, CD88, CD89, CD98, CD100, CD103, CD111,
 CD112, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a,
 CD120b, CDw123, CDw131, CD141, CD162, CD163, CD177, CD312,
 5 IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5, B-B2, B-B8 e receptor de
 antígeno de célula B.

Outras modalidades da invenção se destinam à proteína
 de ligação multivalente, como aqui descrita, que compreende
 uma sequência selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE
 10 SEQ. N^{os}: 2, 4, 6, 103, 105, 107, 109, 332, 333, 334, e
 345. Outras modalidades são dirigidas à proteína de ligação
 multivalente que compreende uma sequência selecionada do
 grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 355, 356, 357,
 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364 e 365.

15 Em outras modalidades, a proteína de ligação
 multivalente e multiespecífica com função efetora possui um
 primeiro domínio de ligação e um segundo domínio de ligação
 que reconhecem um par de alvos selecionado do grupo que
 consiste em EPHB4-KDR e TIE-TEK. Nessas modalidades, a
 20 proteína possui um primeiro domínio de ligação que
 reconhece EPHB4 e um segundo domínio de ligação que
 reconhece KDR, ou um primeiro domínio de ligação que
 reconhece KDR e um segundo domínio de ligação que reconhece
 EPHB4. De forma análoga, a proteína pode ter um primeiro
 25 domínio de ligação que reconhece TIE e um segundo domínio
 de ligação que reconhece TEK, ou um primeiro domínio de
 ligação que reconhece TEK e um segundo domínio de ligação
 que reconhece TIE.

Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma
 30 proteína de ligação multivalente com função efetora, em que

a sub-região constante reconhece um receptor F_c de célula efetora (por exemplo, $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$, $Fc\gamma RIII$, $Fc\alpha R$ e $Fc\epsilon RI$). Em modalidades particulares, a sub-região constante reconhece uma proteína da superfície de uma célula efetora

5 selecionada do grupo que consiste em CD2, CD3, CD16, CD28, CD32, CD40, CD56, CD64, CD89, $Fc\epsilon RI$, KIR, trombospondina R, NKG2D, 2B4/NAIL e 41BB. A sub-região constante pode compreender um domínio C_{H2} e um domínio C_{H3} derivado de imunoglobulinas, isótipos de anticorpos ou variantes

10 alélicas iguais ou diferentes. Em algumas modalidades, o domínio C_{H3} é truncado e compreende uma sequência do terminal C selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 366, 367, 368, 369, 370 e 371. De preferência, o domínio C_{H2} e o ligante *scorpion* são derivados da mesma

15 classe ou da mesma subclasse de imunoglobulina, quando o ligante for um peptídeo dobradiça-like derivado de uma imunoglobulina.

Algumas proteínas de acordo com a invenção também são contempladas como ainda compreendendo um ligante *scorpion*

20 de pelo menos cerca de 5 aminoácidos anexado à sub-região constante e anexado ao segundo domínio de ligação, localizando, dessa forma, o ligante *scorpion* entre a sub-região constante e o segundo domínio de ligação. Tipicamente, o comprimento do peptídeo ligante *scorpion* é

25 entre 5-45 aminoácidos. Ligantees *scorpion* incluem peptídeos dobradiça-like derivados de regiões de dobradiça de imunoglobulina, por exemplo, regiões de dobradiça de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgE. De preferência, um ligante *scorpion* dobradiça-like reterá pelo menos uma

30 cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto

intercadeias sob condições fisiológicas. Ligantees *scorpion* derivados de IgG1 podem ter uma cisteína ou duas cisteínas, e, de preferência, reterão a cisteína que corresponde a uma cisteína da dobradiça do terminal N de IgG1. Em algumas

5 modalidades, o ligante *scorpion* é estendido em relação a uma região de dobradiça cognata da imunoglobulina e, em modalidades exemplares, compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 351, 352, 353 e 354. Peptídeos não-dobradiça-like também

10 são contemplados como ligantees *scorpion*, desde que esses peptídeos forneçam espaçamento e flexibilidade suficientes para gerar uma proteína de cadeia simples capaz de formar dois domínios de ligação, um localizado em direção a cada terminal (N e C) da proteína em relação a um domínio da

15 sub-região constante localizado mais centralmente. Ligantees *scorpion* não-dobradiça-like exemplares incluem peptídeos da região peduncular de lectinas C do tipo II, por exemplo, as regiões pedunculares de CD69, CD72, CD94, NKG2A e NKG2D. Em algumas modalidades, o ligante *scorpion*

20 compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 373, 374, 375, 376 e 377.

As proteínas também podem compreender um ligante de pelo menos cerca de 5 aminoácidos anexado à sub-região constante e anexado ao primeiro domínio de ligação,

25 localizando, dessa forma, o ligante entre a sub-região constante e o primeiro domínio de ligação. Em algumas modalidades, os ligantees são encontrados entre a sub-região constante e cada um dos dois domínios de ligação, e esses ligantees podem ser da mesma sequência ou de uma

30 sequência diferente, e do mesmo comprimento ou de

comprimentos diferentes.

A sub-região constante das proteínas de acordo com a invenção fornece pelo menos uma função efetora. Qualquer função efetora conhecida na técnica como estando associada a uma imunoglobulina (por exemplo, um anticorpo) é contemplada, por exemplo, uma função efetora selecionada do grupo que consiste em citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC), meia-vida *in vivo* relativamente prolongada (em relação à mesma molécula desprovida de uma sub-região constante), ligação de FcR, ligação de proteína A, e semelhantes. Em algumas modalidades, as meias-vidas prolongadas de proteínas da invenção são de pelo menos 28 horas em um ser humano. Evidentemente, proteínas destinadas à administração a indivíduos não humanos exibirão meias-vidas relativamente prolongadas naqueles indivíduos não humanos, e não necessariamente em seres humanos.

Em geral, as proteínas (incluindo polipeptídeos e peptídeos) da invenção exibem uma afinidade de ligação de menos de 10^{-9} M, ou pelo menos 10^{-6} M, para pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação.

Outro aspecto da invenção se dirige a uma composição farmacêutica que compreende uma proteína, como aqui descrita, e um adjuvante, veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Qualquer adjuvante, veículo ou excipiente conhecido na técnica é útil nas composições farmacêuticas da invenção.

Ainda outro aspecto da invenção fornece um método de

produção de uma proteína, como descrita acima, que compreende a introdução de um ácido nucléico que codifica a proteína em uma célula hospedeira e a incubação da célula hospedeira sob condições adequadas à expressão da proteína, expressando, dessa forma, a proteína, preferivelmente em um nível de pelo menos 1 mg/litro. Em algumas modalidades, o método ainda compreende o isolamento da proteína por sua separação de pelo menos uma proteína com a qual está associada mediante expressão intracelular. Células hospedeiras adequadas para a expressão dos ácidos nucléicos para a produção das proteínas da invenção incluem, sem limitação, uma célula hospedeira selecionada do grupo que consiste em uma célula VERO, uma célula HeLa, uma célula CHO, uma célula COS, uma célula W138, uma célula BHK, uma célula HepG2, uma célula 3T3, uma célula RN, uma célula MDCK, uma célula A549, uma célula PC12, uma célula K562, uma célula HEK293, uma célula N, uma célula de *Spodoptera frugiperda*, uma célula de *Saccharomyces cerevisiae*, uma célula de *Pichia pastoris*, qualquer uma entre diversas células fúngicas, e qualquer uma entre diversas células bacterianas (incluindo, sem limitação, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, e um estreptomiceto).

A invenção também fornece um método de produção de um ácido nucléico que codifica a proteína, como descrito acima, que compreende a ligação de forma covalente da extremidade 3' de um polinucleotídeo que codifica um primeiro domínio de ligação derivado da região variável de uma imunoglobulina à extremidade 5' de um polinucleotídeo que codifica uma sub-região constante, ligado de forma

covalente à extremidade 5' de um polinucleotídeo que codifica um ligante *scorpion* à extremidade 3' do polinucleotídeo que codifica a sub-região constante, e ligado de forma covalente à extremidade 5' de um polinucleotídeo que codifica um segundo domínio de ligação derivado da região variável de uma imunoglobulina à extremidade 3' do polinucleotídeo que codifica o ligante *scorpion*, gerando, dessa forma, um ácido nucléico que codifica uma proteína de ligação multivalente com função efetora. Cada uma dessas regiões codificadoras pode ser separada por uma região codificadora para um ligante ou peptídeo dobradiça-like como parte de uma estrutura de cadeia simples de acordo com a invenção. Em algumas modalidades, o método produz um polinucleotídeo que codifica um primeiro domínio de ligação que compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ. N°: 2 (região variável anti-CD20, orientada V_L-V_H), ID. DE SEQ. N°: 4 (região variável anti-CD28, orientada V_L-V_H) e ID. DE SEQ. N°: 6 (região variável anti-CD28, orientada V_H-V_L) na forma de cadeia simples, e não necessita de montagem a partir de polipeptídeos codificados separadamente, o que deve ocorrer para proteínas heteromultiméricas, incluindo anticorpos naturais. Seqüências de polinucleotídeos exemplares que codificam primeiros domínios de ligação são polinucleotídeos que compreendem qualquer um dos IDS. DE SEQ. N°s: 1, 3 ou 5.

Esse aspecto da invenção também fornece métodos para a produção de ácidos nucléicos codificadores que ainda compreendem um polinucleotídeo ligante inserido entre o polinucleotídeo que codifica um primeiro domínio de ligação

e o polinucleotídeo que codifica uma sub-região constante, o polinucleotídeo ligante que codifica um peptídeo ligante de pelo menos 5 aminoácidos. Adicionalmente, esses métodos produzem ácidos nucléicos que ainda compreendem um polinucleotídeo ligante inserido entre o polinucleotídeo que codifica uma sub-região constante e o polinucleotídeo que codifica um segundo domínio de ligação, o polinucleotídeo ligante que codifica um peptídeo ligante de pelo menos 5 aminoácidos. De preferência, os ligantees peptídicos codificados possuem entre 5 e 45 aminoácidos.

A identidade das regiões do ligante presentes entre BD1 e EFD ou EFD e BD2 pode ser derivada de outras seqüências identificadas de membros homólogos da superfamília das imunoglobulinas. No desenvolvimento de novos ligantees derivados de seqüências existentes presentes em membros homólogos da superfamília das imunoglobulinas, pode ser preferível evitar trechos de seqüências similares àqueles localizados entre a extremidade de um domínio C-like e o domínio transmembrana, na medida em que essas seqüências são freqüentemente substratos para a clivagem por protease de receptores de superfície da célula para a criação de formas solúveis. Comparações de seqüências entre membros diferentes da superfamília e subfamílias de Ig podem ser comparadas quanto a similaridades entre moléculas nas seqüências liganteas que unem múltiplos domínios V-like ou entre os domínios V e C-like. A partir dessa análise, podem surgir padrões de seqüências conservadas, de ocorrência natural; essas seqüências, quando usadas como ligantees entre subdomínios das proteínas de fusão multivalentes, devem ser

mais resistentes à protease, podem facilitar a dobragem entre as regiões em alça da Ig, e não seriam imunogênicas, já que ocorrem nos domínios extracelulares de moléculas endógenas da superfície celular.

5 Os próprios ácidos nucleicos compreendem outro aspecto da invenção. São contemplados ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das proteínas da invenção aqui descritas. Dessa forma, os ácidos nucleicos da invenção compreendem, na ordem de 5' para 3', uma região
10 codificadora para um primeiro domínio de ligação, uma sequência da sub-região constante e uma região codificadora para um segundo domínio de ligação. Também são contemplados ácidos nucleicos que codificam proteínas variantes nas quais os dois domínios de ligação e as sequências da sub-
15 região constante são, coletivamente, pelo menos 80% e, de preferência, pelo menos 85%, 90%, 95% ou 99% idênticas em termos de sequência de aminoácidos em relação às sequências combinadas de uma sequência conhecida da região variável de imunoglobulina e de uma sequência conhecida da sub-região
20 constante. Alternativamente, as proteínas variantes da invenção são codificadas por ácidos nucleicos que hibridizam para um ácido nucleico que codifica uma proteína não variante da invenção sob condições de hibridização rigorosas de cloreto de sódio 0,015 M, citrato de sódio
25 0,0015 M a 65-68°C, ou cloreto de sódio 0,015 M, citrato de sódio 0,0015 M e formamida 50% a 42°C. Ácidos nucleicos variantes da invenção exibem a capacidade para hibridizar sob as condições definidas imediatamente acima, ou exibem 90%, 95%, 99% ou 99,9% de identidade de sequência para um
30 ácido nucleico que codifica uma proteína não variante de

acordo com a invenção.

Em aspectos relacionados, a invenção fornece um vetor que compreende um ácido nucléico como descrito acima, além de células hospedeiras que compreendem um vetor ou um ácido nucléico, como aqui descrito. Qualquer vetor conhecido na técnica pode ser usado (por exemplo, plasmídeos, fagomídeos, fasmídeos, cosmídeos, vírus, cromossomos artificiais, vetores *shuttle*, e semelhantes) e aqueles habilitados na técnica irão reconhecer quais vetores são particularmente adequados para certa finalidade. Por exemplo, nos métodos de produção de uma Proteína, de acordo com a invenção, é selecionado um vetor de expressão operacional na célula hospedeira de escolha. De forma similar, é contemplada qualquer célula hospedeira capaz de ser geneticamente transformada com um ácido nucléico ou vetor da invenção. Células hospedeiras preferidas são células hospedeiras eucarióticas superiores, embora células hospedeiras eucarióticas inferiores (por exemplo, levedura) e células hospedeiras procarióticas (bacterianas) sejam contempladas.

Outro aspecto da invenção se dirige a um método de indução de lesão a uma célula-alvo que compreende o contato de uma célula-alvo com uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína, como aqui descrita. Em algumas modalidades, a célula-alvo é colocada em contato *in vivo* por administração da proteína, ou de um ácido nucléico codificador, como organismo que necessita. São contemplados dentro desse aspecto da invenção métodos nos quais a proteína de ligação multivalente de cadeia simples induz uma quantidade aditiva de lesão à célula-alvo, que é aquela

quantidade de lesão esperada pela soma da lesão atribuível aos anticorpos separados que compreendem um ou outro dos domínios de ligação. Também são contemplados métodos nos quais a proteína de ligação multivalente de cadeia simples

5 induz uma quantidade de lesão sinérgica à célula-alvo comparada à soma da lesão induzida por um primeiro anticorpo que compreende o primeiro domínio de ligação, mas não o segundo domínio de ligação, e um segundo anticorpo que compreende o segundo domínio de ligação, mas não o

10 primeiro domínio de ligação. Em algumas modalidades, a proteína de ligação multivalente de cadeia simples é multiespecífica e compreende um par de domínios de ligação que reconhece especificamente um par de antígenos selecionados do grupo que consiste em CD19/CD20, CD20/CD21,

15 CD20/CD22, CD20/CD40, CD20/CD79a, CD20/CD79b, CD20/CD81, CD21/CD79b, CD37/CD79b, CD79b/CD81, CD19/CL II (ou seja, classe II do MHC), CD20/CL II, CD30/CL II, CD37/CL II, CD72/CL II e CD79b/CL II.

Esse aspecto da invenção também compreende métodos nos

20 quais a proteína de ligação multivalente e multiespecífica de cadeia simples induz uma quantidade inibida de lesão à célula-alvo comparada à soma da lesão induzida por um primeiro anticorpo que compreende o primeiro domínio de ligação, mas não o segundo domínio de ligação, e um segundo

25 anticorpo que compreende o segundo domínio de ligação, mas não o primeiro domínio de ligação. Modalidades exemplares incluem métodos nos quais a proteína de ligação multivalente e multiespecífica de cadeia simples compreende um par de domínios de ligação que reconhece especificamente

30 um par de antígenos selecionados do grupo que consiste em

CD20/CL II, CD21/CD79b, CD22/CD79b, CD40/CD79b, CD70/CD79b, CD72/CD79b, CD79a/CD79b, CD79b/CD80, CD79b/CD86, CD21/CL II, CD22/CL II, CD23/CL II, CD40/CL II, CD70/CL II, CD80/CL II, CD86/CL II, CD19/CD22, CD20/CD22, CD21/CD22, CD22/CD23, 5 CD22/CD30, CD22/CD37, CD22/CD40, CD22/CD70, CD22/CD72, CD22/79a, CD22/79b, CD22/CD80, CD22/CD86 e CD22/CL II.

Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método de tratamento de um distúrbio de proliferação celular, por exemplo, câncer, que compreende a 10 administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína (como aqui descrita) ou de um ácido nucléico codificador, a um organismo que necessita. Aqueles habilitados na técnica, incluindo profissionais médicos e veterinários, são capazes de identificar organismos que 15 necessitam de tratamento. Distúrbios contemplados pela invenção passíveis de tratamento incluem um distúrbio selecionado do grupo que consiste em um câncer, um distúrbio autoimune, infecção pelo vírus do sarcoma de Rous e inflamação. Em algumas modalidades, a proteína é 20 administrada por expressão *in vivo* de um ácido nucléico que codifica a proteína, como aqui descrito. A invenção também compreende a administração da proteína por uma via selecionada do grupo que consiste em injeção intravenosa, injeção intra-arterial, injeção intramuscular, injeção 25 subcutânea, injeção intraperitoneal e injeção direta no tecido.

Outro aspecto da invenção é dirigido a um método para a atenuação de um sintoma associado a um distúrbio de proliferação celular que compreende a administração de uma 30 quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína, como

aqui descrito, a um organismo que necessita. Aqueles habilitados na técnica também são capazes de identificar aqueles distúrbios, ou doenças ou condições, que exibem sintomas que podem ser atenuados. Em algumas modalidades, o
5 sintoma é selecionado do grupo que consiste em dor, calor, edema e rigidez articular.

Ainda outro aspecto da invenção se dirige a um método de tratamento de uma infecção associada a um agente infeccioso que compreende a administração de uma quantidade
10 terapeuticamente eficaz de uma Proteína, de acordo com a invenção a um paciente que necessita, em que a proteína compreende um domínio de ligação que se liga especificamente a uma molécula-alvo do agente infeccioso. Agentes infecciosos passíveis de tratamento de acordo com
15 esse aspecto da invenção incluem células procarióticas e eucarióticas, vírus (incluindo bacteriófago), objetos estranhos e organismos infecciosos como, por exemplo, parasitas (por exemplo, parasitas de mamíferos).

Um aspecto relacionado da invenção é dirigido a um
20 método para a atenuação de um sintoma de uma infecção associada a um agente infeccioso que compreende a administração de uma quantidade eficaz de uma Proteína, de acordo com a invenção a um paciente que necessita, em que a proteína compreende um domínio de ligação que se liga
25 especificamente a uma molécula-alvo do agente infeccioso. Aqueles habilitados nas técnicas médicas e veterinárias serão capazes de determinar uma quantidade eficaz de uma proteína em cada caso específico, com a utilização de experimentação de rotina.

30 Ainda outro aspecto relacionado da invenção é um

método de redução do risco de infecção atribuível a um agente infeccioso, que compreende a administração de uma quantidade profilaticamente eficaz de uma Proteína, de acordo com a invenção a um paciente em risco de desenvolver
5 a infecção, em que a proteína compreende um domínio de ligação que se liga especificamente a uma molécula-alvo do agente infeccioso. Aqueles habilitados na técnica relevante serão capazes de determinar uma quantidade profilaticamente eficaz de uma proteína em cada caso específico, com a
10 utilização de experimentação de rotina.

Outro aspecto da invenção se dirige à proteína de ligação multivalente de cadeia simples descrita acima, em que pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação se liga especificamente a um
15 antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 e um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal.

Em certas modalidades, um entre o primeiro domínio de
20 ligação e o segundo domínio de ligação se liga especificamente ao CD20 e, em algumas dessas modalidades, o outro domínio de ligação se liga especificamente a um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a,
25 CD79b, CD80, CD81, CD86 e um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal. Por exemplo, em uma modalidade, o primeiro domínio de ligação é capaz de se ligar especificamente ao CD20, enquanto o segundo domínio de ligação é capaz de se ligar especificamente, por
30 exemplo, ao CD19. Em outra modalidade, o primeiro domínio

de ligação se liga ao CD19, enquanto o segundo domínio de ligação se liga ao CD20. Uma modalidade na qual ambos os domínios de ligação se ligam ao CD20 também é contemplada.

Em certas outras modalidades de acordo com esse
5 aspecto da invenção, um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação se liga especificamente ao CD79b, e, em algumas dessas modalidades, o outro domínio de ligação se liga especificamente a um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD21, CD22, CD23,
10 CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 e um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal. Modalidades exemplares incluem proteínas de ligação de cadeia simples multiespecíficas e multivalentes distintas nas quais um
15 primeiro domínio de ligação:segundo domínio de ligação se liga especificamente ao CD79b:CD19 ou CD19:CD79b. Uma proteína de ligação multivalente que possui primeiro e segundo domínios de ligação que reconhecem CD79b também é contemplada.

20 Ainda em outras modalidades, um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação se liga especificamente a um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal e, em algumas dessas modalidades, o outro domínio de ligação se liga
25 especificamente a um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 e um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal. Por exemplo, em uma modalidade, o primeiro domínio de
30 ligação é capaz de se ligar especificamente a um peptídeo

da classe II do complexo de histocompatibilidade principal, enquanto o segundo domínio de ligação é capaz de se ligar especificamente, por exemplo, ao CD19. Em outra modalidade, o primeiro domínio de ligação se liga ao CD19, enquanto o
5 segundo domínio de ligação se liga a um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal. Uma modalidade na qual ambos os domínios de ligação se ligam a um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal também é contemplada.

10 Ainda em outras modalidades de acordo com esse aspecto da invenção, um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação se liga especificamente ao CD22, e, em algumas dessas modalidades, o outro domínio de ligação se liga especificamente a um antígeno selecionado
15 do grupo que consiste em CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 e um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal. Modalidades exemplares incluem proteínas de ligação de cadeia simples
20 multiespecíficas e multivalentes distintas nas quais um primeiro domínio de ligação:segundo domínio de ligação se liga especificamente ao CD22:CD19 ou CD19:CD22. Uma proteína de ligação multivalente que possui primeiro e segundo domínios de ligação que reconhecem CD22 também é
25 contemplada.

Um aspecto relacionado da invenção é dirigido à proteína de ligação multivalente de cadeia simples descrita acima em que a proteína possui um efeito sinérgico sobre o comportamento de uma célula-alvo em relação à soma dos
30 efeitos de cada um dos domínios de ligação. Em algumas

modalidades, a proteína compreende um par de domínios de ligação que reconhece especificamente um par de antígenos selecionados do grupo que consiste em CD20-CD19, CD20-CD21, CD20-CD22, CD20-CD40, CD20-CD79a, CD20-CD79b e CD20-CD81.

5 A invenção ainda compreende uma proteína de ligação multivalente de cadeia simples como descrita acima, em que a proteína possui um efeito aditivo sobre o comportamento de uma célula-alvo em relação à soma dos efeitos de cada um dos domínios de ligação. Modalidades de acordo com esse
10 aspecto da invenção incluem proteínas multiespecíficas que compreendem um par de domínios de ligação que reconhece especificamente um par de antígenos selecionados do grupo que consiste em CD20-CD23, CD20-CD30, CD20-CD37, CD20-CD70, CD20-CD20-CD86, CD79b-CD37, CD79b-CD81, peptídeo da classe
15 II do complexo de histocompatibilidade principal-CD30, e peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD72.

Ainda outro aspecto relacionado da invenção é uma proteína de ligação multivalente de cadeia simples, como
20 descrita acima, em que a proteína possui um efeito inibidor sobre o comportamento de uma célula-alvo em relação à soma dos efeitos de cada um dos domínios de ligação. Em algumas modalidades, a proteína é multiespecífica e compreende um par de domínios de ligação que reconhece especificamente um
25 par de antígenos selecionados do grupo que consiste em CD20-peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal, CD79b-CD19, CD79b-CD20, CD79b-CD21, CD79b-CD22, CD79b-CD23, CD79b-CD30, CD79b-CD40, CD79b-CD70, CD79b-CD72, CD79b-CD79a, CD79b-CD80, CD79b-
30 CD86, CD79b-peptídeo da classe II do complexo de

histocompatibilidade principal, peptídeo da classe II do
 complexo de histocompatibilidade principal-CD19, peptídeo
 da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-
 CD20, peptídeo da classe II do complexo de
 5 histocompatibilidade principal-CD21, peptídeo da classe II
 do complexo de histocompatibilidade principal-CD22,
 peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade
 principal-CD23, peptídeo da classe II do complexo de
 histocompatibilidade principal-CD37, peptídeo da classe II
 10 do complexo de histocompatibilidade principal-CD40,
 peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade
 principal-CD70, peptídeo da classe II do complexo de
 histocompatibilidade principal-CD79a, peptídeo da classe II
 do complexo de histocompatibilidade principal-CD79b,
 15 peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade
 principal-CD80, peptídeo da classe II do complexo de
 histocompatibilidade principal-peptídeo da classe II do
 complexo de histocompatibilidade principal-CD86, CD22-CD19,
 CD22-CD40, CD22-CD79b, CD22-CD86 e CD22-peptídeo da classe
 20 II do complexo de histocompatibilidade principal.

Outro aspecto da invenção é um método de identificação
 de pelo menos um dos domínios de ligação da molécula de
 ligação multivalente, por exemplo, uma molécula de ligação
 multiespecífica descrita acima, que compreende: (a) o
 25 contato de um anticorpo anti-isotípico com um anticorpo que
 reconhece especificamente um primeiro antígeno e um
 anticorpo que reconhece especificamente um segundo
 antígeno; (b) o contato adicional de um alvo que compreende
 pelo menos um dos referidos antígenos com a composição da
 30 etapa (a); e (c) a medida de uma atividade do alvo, em que

a atividade é usada para identificar pelo menos um dos domínios de ligação da molécula de ligação multivalente. Em algumas modalidades, o alvo é uma célula doente, por exemplo, uma célula cancerígena (por exemplo, uma célula B cancerígena) ou uma célula B produtora de auto-anticorpo.

Em cada um dos métodos da invenção descritos anteriormente, é contemplado que o método pode ainda compreender diversas proteínas de ligação multivalentes de cadeia simples. Em algumas modalidades, um domínio de ligação de uma primeira proteína de ligação multivalente de cadeia simples e um domínio de ligação de uma segunda proteína de ligação multivalente de cadeia simples induzem um efeito sinérgico, aditivo ou inibidor sobre uma célula-alvo, por exemplo, uma quantidade sinérgica, aditiva ou inibidora de lesão à célula-alvo. Os efeitos sinérgicos, aditivos ou inibidores de diversas proteínas de ligação multivalentes de cadeia simples são determinados por comparação dos efeitos dessas diversas proteínas com o efeito combinado de um anticorpo que compreende um dos domínios de ligação e um anticorpo que compreende o outro domínio de ligação.

Um aspecto relacionado da invenção é dirigido a uma composição que compreende diversas proteínas de ligação multivalentes de cadeia simples como descrito acima. Em algumas modalidades, a composição compreende diversas proteínas de ligação multivalentes de cadeia simples, em que um domínio de ligação de uma primeira proteína de ligação multivalente de cadeia simples e um domínio de ligação de uma segunda proteína de ligação multivalente de cadeia simples são capazes de induzir um efeito sinérgico,

aditivo ou inibidor sobre uma célula-alvo, por exemplo, uma quantidade sinérgica, aditiva ou inibidora de lesão à célula-alvo.

A invenção ainda engloba uma composição farmacêutica
5 que compreende a composição descrita acima, e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Além disso, a invenção compreende um kit que compreende a composição como aqui descrita, e um conjunto de instruções para a administração da referida composição para exercer um
10 efeito sobre uma célula-alvo, por exemplo, para danificar a célula-alvo.

Finalmente, a invenção também engloba um kit que compreende a proteína, como aqui descrita, e um conjunto de instruções para a administração da proteína para tratar um
15 distúrbio de proliferação celular ou para atenuar um sintoma do distúrbio de proliferação celular.

Outras características e vantagens da presente invenção serão mais bem compreendidas por referência à descrição detalhada a seguir, incluindo os exemplos.

20 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra uma reapresentação esquemática das moléculas multivalentes de cadeia simples previstas pela invenção. Subdomínios individuais do cassete de expressão da proteína de fusão são indicados por formas/blocos
25 separados na figura. BD1 refere-se ao domínio de ligação 1, ligante 1 refere-se a qualquer peptídeo ligante ou dobradiça-like potencial entre BD1 e o "domínio da função efetora", indicado como EFD. Esse subdomínio é normalmente uma forma projetada do domínio F_c de IgG1 humana, mas pode
30 incluir outros subdomínios com uma ou mais funções

efetoras, como aqui definidas. Ligante 2 refere-se à sequência ligante, caso exista, presente entre o terminal carboxi do EFD e o domínio de ligação 2, BD2.

A Figura 2 mostra um *Western blot* de proteínas não
 5 reduzidas expressas em células COS. A proteína foi secretada no meio de cultura, e sobrenadantes de cultura isolados após 48-72 horas de células transfectadas transitoriamente por centrifugação. Trinta microlitros, 30 μ l de sobrenadante bruto foram carregados em cada poço do
 10 gel. Identificações das raias: 1- marcadores de peso molecular, com os numerais indicando quilodáltons; 2- 2H7-IgG-STD1-2E12 LH; 3- 2H7-IgG-STD1-2E12 HL, 4- 2H7-IgG-STD2-2E12 LH; 5- 2H7-IgG-STD2-2E12 HL; 6- 2E12 LH SMIP; 7- 2E12 HL SMIP; 8- 2H7 SMIP. "2H7" refere-se a uma construção de
 15 cadeia simples, em que BD1 codifica o domínio de ligação específico para CD20 (2H7) na orientação V_L-V_H ; "2E12" refere-se a um domínio de ligação específico para CD28; - IgG- refere-se a uma construção de cadeia simples, com uma dobradiça que codifica uma sequência em que todos os C são
 20 mutados para S (sss), e os domínios C_{H2} e C_{H3} de IgG1 contêm mutações que eliminam ambas as funções efetoras, ADCC e CDC (P238S e P331 S), "STD 1" refere-se a um ligante de 20 de aminoácidos (identificado na Figura 7 como "STD1=20aa") inserido adjacente ao BD2 na orientação V_L-V_H , ou 2E12 (V_L-V_H). "STD1-HL" refere-se a uma construção similar à
 25 descrita anteriormente, mas com as regiões BD2 V na orientação V_H-V_L , da seguinte forma: 2H7-sssIgG (P238/331S)-ligante de 20 aminoácidos-2E12 (V_H-V_L). "STD2-LH" refere-se a 2H7-sssIgG (P238/331S)-ligante de 38
 30 aminoácidos-2E12 (V_L-V_H); "STD2-LH" refere-se a 2H7-sssIgG

(P238/331SS)-ligante de 38 aminoácidos-2E12 (V_H - V_L); "SMIP" refere-se a pequeno produto imunofarmacêutico modular; e "H" geralmente refere-se a V_H , enquanto "L" geralmente refere-se a V_L . A menos que indicado de forma diferente,
 5 todas as orientações de proteínas são orientações do terminal N para o terminal C.

A **Figura 3** mostra dois gráficos de colunas que ilustram as propriedades de ligação dos derivados LH e HL de 2H7-sssIgG (P238S/P331S)-STD1-2e12 expressos por células
 10 COS. Esses experimentos foram realizados com sobrenadantes de cultura brutos, e não com proteínas purificadas. Diluições seriadas desde não diluído até 16X dos sobrenadantes de cultura foram incubadas com células que expressam CD20 (WIL-2S) ou células que expressam CD28 (CD28
 15 CHO). A atividade de ligação nos sobrenadantes foi comparada com amostras de controle que testam a ligação do SMIP de especificidade única relevante, por exemplo, TRU-015 ou 2e12 VLVH, ou SMIPs de 2e12VHVH. A ligação em cada amostra foi detectada com o uso de anti-IgG humana de cabra
 20 conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) em uma diluição de 1:100.

A **Figura 4** é um histograma que mostra o padrão de ligação de versões purificadas com proteína A das proteínas testadas na Figura 3 às células WIL2-S. "TRU015" é um SMIP
 25 específico para CD20. Duas proteínas de ligação multiespecíficas com função efetora também foram analisadas: "2H7-2E12 LH" possui domínio de ligação 2, específico para CD28, na orientação V_L - V_H ; "2H7-2E12 HL" possui domínio de ligação 2, específico para CD28, na
 30 orientação V_H - V_L . Cada uma das proteínas foi testada quanto

à ligação a 5 µg/ml, e a ligação detectada com anti-IgG humana de cabra conjugada a FITC a 1:100. Veja a descrição para a Figura 2 acima para descrições mais completas das moléculas testadas.

5 A **Figura 5** mostra dois histogramas que ilustram a ligação por proteínas de ligação multiespecíficas com função efetora purificadas com proteína A às células CHO que expressam CD28. "2H7-2E12 LH" possui domínio de ligação 2, específico para CD28, na orientação V_L-V_H ; "2H7-2E12 HL"

10 possui domínio de ligação 2, específico para CD28, na orientação V_H-V_L . Cada uma das proteínas foi testada quanto à ligação a 5 µg/ml, e a ligação foi detectada com anti-IgG humana de cabra conjugada a FITC a 1:100. Veja as descrições na Figura 2 para uma descrição mais completa das

15 moléculas testadas.

Figura 6: A) mostra uma tabela que identifica os ligantes que unem a sub-região constante e o domínio de ligação 2. Os ligantes são identificados por nome, seqüência, identificador de seqüência, comprimento de

20 seqüência, e a seqüência da fusão com domínio de ligação 2.

B) mostra uma tabela que identifica diversas construções que identificam elementos de moléculas exemplificadas de acordo com a invenção. Além da identificação das moléculas de ligação multivalentes por nome, os elementos dessas

25 moléculas são revelados em termos de domínio de ligação 1 (BD1), da sub-região constante (domínio *hinge* e efetor ou EFD), um ligante (veja a Fig. 6A para informações adicionais em relação aos ligantes), e domínio de ligação 2 (BD2). São fornecidas as seqüências das várias proteínas

30 de ligação multivalentes exemplificadas, e são

identificadas na figura por um identificador de sequência. Outras proteínas de ligação multivalentes possuem elementos ou ordens de elemento alteradas, com alterações previsíveis na sequência em relação às sequências reveladas.

5 A **Figura 7** mostra um gráfico composto em colunas que ilustra a ligação de proteínas purificadas em uma concentração fixa, única, às células WIL-2S que expressam CD20 e às células CHO que expressam CD28. "H1-H6" refere-se às moléculas 2H7-sss-hIgG-Hx-2e12 com os ligantes H1-H6 e
 10 as regiões 2e12 V na orientação de V_H-V_L . "L1-L6" refere-se às moléculas 2H7-sss-hIgG-Lx-2e12 com os ligantes L1-L6 e as regiões 2e12 V na orientação de V_L-V_H . Todas as moléculas foram testadas em uma concentração de 0,72 µg/ml, e a ligação detectada com o uso de anti-IgG humana de cabra
 15 conjugada a FITC a 1:100. A intensidade de fluorescência média para cada amostra foi então tabulada como gráficos de barras pareadas para os dois tipos de células-alvo testados versus cada uma das construções multivalentes que estão sendo testadas, L1-L6 ou H1-H6.

20 A **Figura 8** mostra fotografias de géis de SDS-PAGE não redutores e redutores corados como Coomassie. Esses géis mostram o efeito da sequência ligante variante/comprimento sobre a proteína 2H7-sss-hIgG-Hx-2e12 HL sobre as quantidades das duas bandas de proteína predominantes
 25 visualizadas no gel.

A **Figura 9** mostra *Western Blots* das proteínas de fusão [2H7-sss-hIgG-H6-2e12] e os SMIPs de especificidade única relevantes sondados com: (a) CD28mIgG ou com b) um Fab reativo com a especificidade de 2H7. Os resultados mostram
 30 que a presença do ligante H6 resulta na geração de formas

clivadas das construções multivalentes que não possuem a especificidade de ligação de CD28.

A **Figura 10** mostra curvas de ligação das diferentes variantes de ligante para as formas do ligante H1-H6 [TRU015-sss-IgG-Hx-2e12 HL]. O Primeiro painel mostra as curvas de ligação para ligação às células WIL-2S que expressam CD20. O segundo painel mostra as curvas de ligação para ligação das diferentes formas às células CHO CD28. Essas curvas de ligação foram geradas com diluições
5
10
15
20
25
30
seriais de proteína de fusão purificada com proteína A, e a ligação detectada com o uso de anti-IgG humana de cabra conjugada a FITC a 1:100.

A **Figura 11** mostra uma tabela que resume os resultados do fracionamento por SEC (cromatografia por exclusão de tamanho) de proteínas de fusão multiespecíficas 2H7-sss-IgG-2e12 HL com ligantes variantes H1-H7. Cada linha na tabela lista uma variante do ligante diferente das proteínas de fusão [2H7-sss-IgG-Hx-2e12-HL]. O tempo de retenção do pico de interesse (POI), e a percentagem da proteína de fusão presente no POI, e a percentagem de proteína encontrada em outras formas, também são tabulados. A clivagem das moléculas também é listada, com o grau de clivagem indicado de forma qualitativa, com (Sim), Sim, e SIM, ou Não sendo as quatro escolhas possíveis.

A **Figura 12** mostra dois gráficos com curvas de ligação para proteínas de fusão multiespecíficas [2H7-sss-hIgG-Hx-2e12] com ligantes variantes H3, H6, e ligantes H7 às células que expressam CD20 ou CD28. As diluições seriais das proteínas de fusão purificadas com proteína A de 10
30
µg/ml a 0,005 µg/ml foram incubadas com células WIL-2S que

expressam CD20 ou células CHO CD28. A ligação foi detectada com o uso de anti-IgG humana de cabra conjugada a FITC a 1:100. O Pannel A mostra a ligação às células WIL-2S, e o pannel B mostra a ligação às células CHO CD28.

5 A **Figura 13** mostra os resultados de um ensaio de ligação alternativo gerado pelas moléculas usadas para a Figura 12. Nesse caso, as proteínas de fusão foram inicialmente ligadas às células WIL-2S que expressam CD20, e a ligação foi então detectada com CD28mIgG (5 µg/ml) e
10 reagente de anticamundongo FITC a 1:100. Esses resultados demonstram a ligação simultânea tanto ao CD20 quanto ao CD28 na mesma molécula.

 A **Figura 14** mostra resultados obtidos com o uso de outra variante da construção de fusão multiespecífica.
15 Nesse caso, foram feitas modificações na especificidade para BD2, de forma que as regiões para o anticorpo G28-1 fossem usadas para criar um domínio de ligação específico para CD37. São mostrados dois gráficos que ilustram a habilidade relativa de anticorpos de CD20 e/ou CD37 para
20 bloquear a ligação da proteína de fusão multiespecífica [2H7-sss-IgG-Hx-G28-1] às células Ramos ou BJAB que expressam os alvos de CD20 e CD37. Cada tipo de célula foi pré-incubado com o anticorpo específico para CD20 (25 µg/ml) ou o anticorpo específico para CD37 (10 µg/ml) ou
25 ambos os reagentes (esses são reagentes de camundongo anti-humanos), antes da incubação com a proteína de fusão multiespecífica. A ligação da proteína de fusão multiespecífica foi então detectada com um reagente anti-IgG humana de cabra conjugado a FITC a 1:100 (pré-adsorvido
30 ao camundongo para eliminar reatividade cruzada).

A **Figura 15** mostra os resultados de um ensaio de ADCC realizado com células BJAB-alvo, células efetoras PBMC e com a proteína de fusão específica para CD20-hIgG-CD37 como o reagente de teste. Para uma descrição completa do procedimento, veja o exemplo apropriado. O gráfico tabula a concentração de proteína de fusão versus o % de morte específica em cada dosagem testada para os reagentes SMIP de especificidade única, e para as variantes LH e HL de [2H7-sss-hIgG-STD1-G28-1]. Cada série de dados tabula os efeitos de dose-resposta para uma dessas proteínas de fusão de cadeia simples de especificidade única ou multiespecíficas.

A **Figura 16** mostra uma tabela que tabula os resultados de um experimento de co-cultivo em que os PBMC foram cultivados na presença de TRU-015, G28-1 SMIP, ambas as moléculas juntas, ou a variante [2H7-sss-IgG-H7-G28-1HL]. As proteínas de fusão foram usadas a 20 µg/ml, e incubadas por 24 horas ou 72 horas. As amostras foram então coradas com anticorpos de CD3 conjugados a FITC, e anticorpos específicos para CD19 ou CD40 conjugados a PE, e depois submetidas à citometria de fluxo. A percentagem de células em cada saída foi então tabulada.

A **Figura 17** mostra dois gráficos de colunas dos efeitos sobre a apoptose da linhagem de células B após incubação por 24 horas com a molécula de [2H7-sss-hIgG-H7-G28-1 HL] ou SMIPs de especificidade única para CD20 e/ou CD37 de controle isoladamente ou em combinação. A percentagem de células positivas para anexina V-iodeto de propídio é tabulada em função do tipo de reagente de teste usado para os experimentos de co-incubação. O Painel A

mostra os resultados obtidos com o uso de células Ramos, e o painel B mostra os resultados para células Daudi. Cada SMIP único dirigido ao CD20 ou CD37 é mostrado nas concentrações indicadas; além disso, quando foram usadas 5 combinações dos dois reagentes, a quantidade relativa de cada reagente é mostrada entre parênteses. Para a proteína de fusão multiespecífica CD20-CD37, foram testadas as concentrações de 5, 10 e 20 µg/ml.

A Figura 18 mostra dois gráficos das variantes da 10 molécula de [2H7-hIgG-G19-4] e sua ligação às células que expressam CD3 (Jurkats) ou células que expressam CD20 (WIL-2S). As moléculas incluem [HL de 2H7-sss-hIgG-STD1-G19-4], LH e [HL de 2H7-csc-hIgG-STD1-G19-4]. Proteínas de fusão purificadas com Proteína A foram tituladas a partir de 20 15 µg/ml até 0,05 µg/ml, e a ligação detectada com o uso de anti-IgG humana de cabra conjugada a FITC a 1:100. A MFI (intensidade de fluorescência média) é tabulada como uma função da concentração de proteína.

A Figura 19 mostra os resultados de ensaios de ADCC 20 realizados com as variantes da molécula [HL de 2H7-hIgG-STD1-G19-4] com uma dobradiça SSS ou uma dobradiça CSC, células BJAB-alvo, e PBMCs humanos totais como células efetoras ou PBMC com eliminação de células NK como células efetoras. A morte foi pontuada como uma função da 25 concentração das proteínas de fusão multiespecíficas. A morte observada com essas moléculas foi comparada com aquela observada com o uso de G19-4, TRU-015 ou de uma combinação desses dois reagentes. Cada série de dados tabula um reagente de teste diferente, com o percentual de 30 morte específica tabulado como uma função da concentração

de proteína.

A **Figura 20** mostra a percentagem de células B Ramos que coraram positivas com Anexina V (Ann) e/ou iodeto de propídio (PI) após incubação de um dia para o outro com cada membro de uma painel-matriz de anticorpos de células B (2 µg/ml) na presença, ou ausência, de um anticorpo anti-CD20 (presente a 2 µg/ml, quando adicionado). Anticorpo secundário de cabra anticamundongo sempre esteve presente em uma proporção de concentração de duas vezes em relação aos outros anticorpos (anticorpo da matriz isoladamente, ou anticorpo da matriz e anticorpo anti-CD20). Barras com listras verticais - anticorpo da matriz (2 µg/ml) representado no eixo X e anticorpo de cabra anticamundongo (4 µg/ml). Barras com listras horizontais - anticorpo da matriz (2 µg/ml) representado no eixo X, anticorpo anti-CD20 (2 µg/ml), e anticorpo de cabra anticamundongo (4 µg/ml). A condição de "2ª etapa" serviu como controle e envolveu a adição de anticorpo de cabra anticamundongo a 4 µg/ml (barra com listras verticais) ou 8 µg/ml (barra com listras horizontais), sem um anticorpo da matriz ou anticorpo anti-CD20. "CL II" (classe II do MHC) nas figuras refere-se a um anticorpo monoclonal que reage de forma cruzada com HLA DR, DQ e DP, ou seja, aos antígenos da Classe II do MHC.

A **Figura 21** mostra a percentagem de células B Ramos que coraram positivas com Anexina V (Ann) e/ou iodeto de propídio (PI) após incubação de um dia para o outro com cada membro de uma painel-matriz de anticorpos de células B (2 µg/ml) na presença, ou ausência, de um anticorpo anti-CD79b (presente a 0,5 ou 1,0 µg/ml, quando adicionado).

Veja a descrição da Figura 20 para a identificação das amostras "CL II" e "2ª etapa". Barras com listras verticais – anticorpo da matriz (2 µg/ml) e anticorpo de cabra anticamundongo (4 µg/ml); barras com listras horizontais – anticorpo da matriz (2 µg/ml), anticorpo anti-CD79b (1,0 µg/ml) e anticorpo de cabra anticamundongo (6 µg/ml); barras pontilhadas – anticorpo da matriz (2 µg/ml), anticorpo anti-CD79b (0,5 µg/ml) e anticorpo de cabra anticamundongo (5 µg/ml).

10 A Figura 22 mostra a percentagem de células B Ramos que coraram positivas com Anexina V (Ann) e/ou iodeto de propídio (PI) após incubação de um dia para o outro com cada membro de uma painel-matriz de anticorpos de células B (2 µg/ml) na presença, ou ausência, de um anticorpo anti-CL
15 II (presente a 0,25 ou 0,5 µg/ml, quando adicionado). Veja a descrição da Figura 20 para a identificação das amostras "CL II" e "2ª etapa". Barras com listras verticais – anticorpo da matriz (2 µg/ml) e anticorpo de cabra anticamundongo (4 µg/ml); barras com listras horizontais – anticorpo da matriz (2 µg/ml), anticorpo anti-CL II (0,5 µg/ml) e anticorpo de cabra anticamundongo (5 µg/ml);
20 barras pontilhadas – anticorpo da matriz (2 µg/ml), anticorpo anti-CL II (0,25 µg/ml) e anticorpo de cabra anticamundongo (4,5 µg/ml).

25 A Figura 23 mostra a percentagem de células B DHL-4 que coraram positivas com Anexina V (Ann) e/ou iodeto de propídio (PI) após incubação de um dia para o outro com cada membro de uma painel-matriz de anticorpos de células B (2 µg/ml) na presença, ou ausência, de um anticorpo anti-
30 CD22 (presente a 2 µg/ml, quando adicionado). Veja a

descrição da Figura 20 para a identificação das amostras "CL II" e "2ª etapa". Barras sólidas – anticorpo da matriz (2 µg/ml) e anticorpo de cabra anticomundongo (4 µg/ml); barras com listras inclinadas – anticorpo da matriz (2 µg/ml), anticorpo anti-CD22 (2 µg/ml) e anticorpo de cabra anticomundongo (8 µg/ml).

Figura 24 fornece um gráfico que demonstra a inibição direta do crescimento de linhagens de células de linfoma Su-DHL6 (triângulos) e DoHH2 (quadrados) por SMIP sem CD20 (símbolos fechados) ou *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 (símbolos abertos).

A **Figura 25** é um gráfico que mostra a inibição direta do crescimento de linhagens de células de linfoma Su-DHL-6 (triângulos) e DoHH2 (quadrados) por SMIP sem anti-CD37 (símbolos fechados) ou *scorpion* monoespecífico anti-CD37 (símbolos abertos).

A **Figura 26** apresenta um gráfico que mostra a inibição direta do crescimento de linhagens de células de linfoma Su-DHL-6 (triângulos) e DoHH2 (quadrados) por uma combinação de dois SMIPs monoespecíficos diferentes (símbolos fechados) ou por um *scorpion* biespecífico CD20-CD37 (símbolos abertos).

A **Figura 27** é um gráfico que revela a inibição direta do crescimento de linhagens de células de linfoma Su-DHL-6 (triângulos) e WSU-NHL (quadrados) por SMIP sem CD20 e combinação de SMIP CD37 (símbolos fechados) ou *scorpion* biespecífico CD20xCD37 (símbolos abertos).

A **Figura 28** fornece histogramas que mostram os efeitos sobre o ciclo celular de *scorpions*. Amostras de células de linfoma DoHH2 foram deixadas separadamente não tratadas,

tratadas com SMIP 016 ou tratadas com o *scorpion* mono específico CD37 x CD37. Barras abertas: fase sub-G1 do ciclo celular; barras pretas: fase G0/G1; sombreado: fase S; e com listras: fase G2/M.

5 A Figura 29 apresenta gráficos de dados que estabelecem que o tratamento de células de linfoma com *scorpions* causou uma capacidade de sinalização aumentada, comparada com SMIPs livres, como medida pelo fluxo de íon cálcio.

10 A Figura 30 fornece gráficos que demonstram citotoxicidade celular dependente de *scorpion*.

A Figura 31 mostra gráficos de dados que indicam que *scorpions* medeiam a citotoxicidade dependente de complemento.

15 A Figura 32 fornece dados de forma gráfica que mostram ligação por ELISA comparativa de um SMIP e um *scorpion* para isoformas de baixa afinidade (B) e de alta afinidade (A) de FcγRIII (CD16).

20 A Figura 33 apresenta gráficos que estabelecem a ligação de um SMIP e um *scorpion* a tipos alélicos de baixa afinidade (A)- e de alta afinidade (B)- de FcγRIII (CD16) na presença de células-alvo.

25 A Figura 34 é um histograma que mostra o nível de expressão de um *scorpion* CD20 x CD20 em dois experimentos (frasco 1 e frasco 2) sob seis condições de cultura diferentes. Barras pretas sólidas: frasco 1; com barras com listras: frasco 2.

A Figura 35 fornece um histograma que mostra o rendimento de produção de um *scorpion* CD20 x CD37.

30 A Figura 36 apresenta géis de SDS-PAGE (sob condições

reductoras e não reductoras) de um SMIP e de um *scorpion*.

A **Figura 37** fornece um gráfico que mostra que *scorpions* retêm a capacidade de ligação às células-alvo. Quadrados preenchidos: SMIP de CD20; triângulos
 5 preenchidos: SMIP de CD37; círculos preenchidos: SMIP de CD20 (2Lm20-4) humanizado; diamante aberto: *scorpion* monoespecífico CD37 x CD37; quadrados abertos: *scorpion* biespecífico CD20 x CD37; e triângulos abertos: *scorpion* humanizado de CD20 (2Lm20-4) x *scorpion* humanizado de CD20
 10 (2Lm20-4).

A **Figura 38** contém gráficos que mostram os resultados de ensaios de ligação competitiva que estabelecem que os domínios de ligação do terminal N e C de *scorpion* participam na ligação à célula-alvo.

15 A **Figura 39** apresenta dados na forma de gráficos que mostram que *scorpions* possuem *off-rates* menores do que SMIPs.

A **Figura 40** mostra um gráfico que estabelece que *scorpions* são estáveis no soro *in vivo*, caracterizado por
 20 uma meia-vida circulante sustentada, reprodutível, para o *scorpion*.

A **Figura 41** fornece um gráfico de dose-resposta para um *scorpion* biespecífico CD20 x CD37, que demonstra a eficácia *in vivo* da administração de *scorpion*.

25 A **Figura 42** mostra a ligação à célula B-alvo por um *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 (S0129) e glico-variantes.

A **Figura 43** fornece gráficos que ilustram *scorpions* CD20xCD20 (parentes e glico-variantes) induzindo morte
 30 mediada por ADCC de células B BJAB.

A Figura 44 mostra um gel que revela os efeitos sobre a estabilidade do *scorpion* que surgem em decorrência de alterações no ligante *scorpion*, incluindo alteração da seqüência daquele ligante e extensão do ligante por adição
 5 de uma seqüência H7 ao ligante, indicada por um "+" na linha H7 sob o gel.

A Figura 45 mostra a ligação às células WIL-2S de um *scorpion* CD20xCD20 (S0129) e variantes do ligante *scorpion* deste.

10 A Figura 46 mostra a morte celular direta de diversas células B por um *scorpion* CD20xCD20 e por um SMIP de CD20.

A Figura 47 revela a morte celular direta de linhagens de células B adicionais por um *scorpion* monoespecífico CD20xCD20.

15 A Figura 48 mostra as capacidades de morte celular direta de cada um dos dois *scorpions* monoespecíficos, ou seja, CD20xCD20 e CD37xCD37, e um *scorpion* biespecífico CD20xCD37, esse último exibindo uma forma diferente de curva de morte.

20 A Figura 49 representa graficamente a resposta de células B Su-DHL-6 a cada um de um *scorpion* CD20xCD20 (S0129), CD37xCD37 e CD20xCD37.

A Figura 50 mostra a capacidade de um *scorpion* biespecífico CD19xCD37 e Rituxan® para matar diretamente
 25 células B Su-DHL-6.

A Figura 51 fornece histogramas que mostram a morte direta de células B DHL-4 por diversos *scorpions* de ligação de CD20 e SMIPs, bem como por Rituxan®, como indicado na figura. Barras azuis: células vivas; barras marrons à
 30 direita de cada par: Anexina+/PI+.

A **Figura 52** fornece uma representação gráfica da morte celular direta de vários *scorpions* de ligação de CD20 e SMIPs, bem como por Rituxan®, como indicado na figura.

A **Figura 53** fornece gráficos da atividade de ADCC
5 induzida por vários *scorpions* de ligação de CD20 e SMIPs, como indicado na figura, bem como por Rituxan®.

A **Figura 54** fornece gráficos da atividade de CDC induzida por vários *scorpions* de ligação de CD20 e SMIPs, como indicado na figura, bem como por Rituxan®.

10 A **Figura 55** fornece histogramas que mostram os níveis de ligação de Clq aos *scorpions* de ligação de CD20 ligados às células B Ramos.

A **Figura 56** fornece gráficos de dispersão de análises FACS que mostram a perda de potencial da membrana
15 mitocondrial atribuível aos *scorpions* de ligação de CD20 (2Lm20-4x2Lm20-4 e 011x2Lm20-4) e Rituxan, em relação aos controles (painel superior); histogramas da percentagem de células com potencial da membrana mitocondrial rompida (MMP rompida: barras pretas) são mostrados no painel inferior.

20 A **Figura 57** fornece histogramas que mostram a ausência relativa de ativação de caspase 3 por *scorpions* de ligação de CD20 (2Lm20-4x2Lm20-4 e 011x2Lm20-4), Rituximab, CD95 e controles.

A **Figura 58** fornece um composto de quatro análises
25 *Western blot* de Poli (ADP-ribose) Polimerase e caspases 3, 7 e 9 de células B que apresentam pouca degradação de qualquer uma dessas proteínas atribuível à ligação dos *scorpions* de ligação de CD20 às células.

A **Figura 59** é um eletroforetograma em gel de DNAs
30 cromossômicos de célula B que apresenta o grau de

fragmentação atribuível à ligação dos *scorpions* de ligação de CD20 às células.

A Figura 60 é um eletroforetograma em gel de imunoprecipitados obtidos com um anticorpo anti-fosfotirosina e com um anticorpo anti-SYK. Os imunoprecipitados foram obtidos de lisados de células B que entraram em contato com *scorpions* de ligação de CD20, como indicado na figura.

A Figura 61 fornece gráficos do índice de combinação de *scorpions* de ligação de CD20 em terapias combinadas com doxorubicina, vincristina e rapamicina.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece composições de peptídeos relativamente pequenos que possuem pelo menos duas regiões ou domínios de ligação, que podem fornecer uma ou mais especificidades de ligação, derivados de domínios de ligação variáveis de imunoglobulinas, por exemplo, anticorpos, dispostos terminalmente em relação a um domínio efetor, que compreendem pelo menos parte de uma região constante de imunoglobulina (ou seja, uma fonte da qual uma sub-região constante, como aqui definida, possa ser derivada), além de ácidos nucleicos, vetores e células hospedeiras envolvidas na produção recombinante desses peptídeos, e métodos de utilização das composições de peptídeos em diversas aplicações diagnósticas e terapêuticas, incluindo o tratamento de um distúrbio, bem como a atenuação de pelo menos um sintoma de um distúrbio desse tipo. As composições de peptídeos organizam vantajosamente um terminal C do segundo domínio de ligação ao domínio efetor, um arranjo que fornece inesperadamente

ligação estericamente não impedida ou menos impedida por pelo menos dois domínios de ligação do peptídeo, ao mesmo tempo em que retém uma função efetora ou funções do domínio efetor disposto centralmente.

- 5 O primeiro e o segundo domínios de ligação dos peptídeos multivalentes de acordo com a invenção podem ser iguais (ou seja, podem possuir seqüências de aminoácidos idênticas ou substancialmente idênticas e ser monoespecíficos) ou diferentes (e ser multiespecíficos).
- 10 Embora diferentes em termos de estrutura primária, o primeiro e o segundo domínios de ligação podem reconhecer e se ligar ao mesmo epitopo de uma molécula-alvo, e seriam, portanto, monoespecíficos. Em muitos casos, no entanto, os domínios de ligação diferirão estruturalmente e se ligarão
- 15 a sítios de ligação diferentes, resultando em uma proteína multiespecífica e multivalente. Aqueles sítios de ligação diferentes podem existir em uma única molécula-alvo ou em moléculas-alvo diferentes. No caso das duas moléculas de
- 20 ligação reconhecerem moléculas-alvo diferentes, aquelas moléculas-alvo poderão existir, por exemplo, sobre ou na mesma estrutura (por exemplo, a superfície da mesma célula), ou aquelas moléculas-alvo podem existir sobre ou em estruturas ou locais separados. Por exemplo, uma
- 25 proteína de ligação multiespecífica de acordo com a invenção pode ter domínios de ligação que se ligam especificamente à molécula-alvo nas superfícies de tipos distintos de células. Alternativamente, um domínio de
- 30 ligação pode se ligar especificamente a um alvo em uma superfície celular e o outro domínio de ligação pode se ligar especificamente a um alvo que não é encontrado

associado a uma célula, por exemplo, uma proteína estrutural extracelular (da matriz) ou uma proteína livre (por exemplo, solúvel ou estromal).

O primeiro e o segundo domínios de ligação são
5 derivados de uma ou mais regiões das mesmas estruturas
protéicas de imunoglobulina, ou de estruturas protéicas de
imunoglobulina diferentes como, por exemplo, moléculas de
anticorpo. O primeiro e/ou o segundo domínios de ligação
podem exibir uma seqüência idêntica à seqüência de uma
10 região de uma imunoglobulina, ou podem ser uma modificação
de uma seqüência desse tipo para fornecer, por exemplo,
propriedades de ligação alteradas ou estabilidade alterada.
Essas modificações são conhecidas na técnica e incluem
alterações na seqüência de aminoácidos que contribuem
15 diretamente para a propriedade alterada como, por exemplo,
ligação alterada, por exemplo, por produzirem uma estrutura
secundária ou de ordem mais elevada alterada no peptídeo.
Também são contempladas seqüências de aminoácidos
modificadas que resultam da incorporação de aminoácidos não
20 nativos, por exemplo, aminoácidos convencionais não
nativos, aminoácidos não convencionais e imino ácidos. Em
algumas modalidades, a seqüência alterada resulta em
processamento pós-tradução alterado, por exemplo, levando a
um padrão de glicosilação alterado.

25 Qualquer um entre uma ampla gama de domínios de
ligação derivados de uma imunoglobulina ou polipeptídeo
imunoglobulina-like (por exemplo, receptor) é contemplado
para uso em *scorpions*. Domínios de ligação derivados de
anticorpos compreendem as regiões CDR de um domínio V_L e um
30 domínio V_H , observadas, por exemplo, no contexto da

utilização de um domínio de ligação de um anticorpo humanizado. Domínios de ligação que compreendem domínios V_L e V_H completos derivados de um anticorpo podem ser organizados em qualquer orientação. Um *scorpion* de acordo com a invenção pode ter qualquer um dos domínios de ligação aqui descritos. Para *scorpions* que possuem pelo menos um domínio de ligação que reconhece uma célula B, *scorpions* exemplares possuem pelo menos um domínio de ligação derivado de CD3, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD38, CD39, CD40, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD78, CD79a/b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD89, CD98, CD126, CD127, CDw130, CD138 ou CDw150. Em algumas modalidades, o *scorpion* é uma proteína de ligação multivalente que compreende pelo menos um domínio de ligação que possui uma seqüência selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 2, 4, 6, 103, 105, 107 e 109. Em algumas modalidades, um *scorpion* compreende um domínio de ligação que compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 332-345. Em algumas modalidades, um *scorpion* compreende um domínio de ligação que compreende uma seqüência derivada de domínios V_L e V_H de imunoglobulina, em que a seqüência é selecionada do grupo que consiste em qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 355-365. A invenção ainda contempla *scorpions* que compreendem um domínio de ligação que possui a orientação oposta de V_L e V_H e possuem seqüências dedutíveis a partir de qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 355-365.

Para modalidades nas quais um ou ambos os domínios de ligação são derivados de mais de uma região de uma

imunoglobulina (por exemplo, uma região V_L de Ig e uma região V_H de Ig), as diversas regiões podem ser unidas por um peptídeo ligante. Além disso, pode ser usado um ligante para unir o primeiro domínio de ligação a uma sub-região

5 constante. A união da sub-região constante a um segundo domínio de ligação (ou seja, domínio de ligação 2 disposto em direção ao terminal C de um *scorpion*) é obtida por um ligante *scorpion*. Esses ligantes *scorpion* têm preferivelmente entre cerca de 2-45 aminoácidos, ou 2-38

10 aminoácidos, ou 5-45 aminoácidos. Por exemplo, o ligante H1 tem comprimento de 2 aminoácidos, e o ligante STD2 tem comprimento de 38 aminoácidos. Além das considerações gerais sobre o comprimento, uma região ligantea *scorpion* adequada para uso nos *scorpions* de acordo com a invenção

15 inclui uma região de dobradiça de anticorpo selecionada do grupo que consiste em dobradiças de IgG, IgA, IgD e IgE e variantes destas. Por exemplo, o ligante *scorpion* pode ser uma região de dobradiça de anticorpo selecionada do grupo que consiste em IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e

20 IgG4 humana, e variantes destas. Em algumas modalidades, a região ligantea *scorpion* possui um único resíduo de cisteína para a formação de uma ligação dissulfeto intercadeias. Em outras modalidades, o ligante *scorpion* possui dois resíduos de cisteína para a formação de

25 ligações dissulfeto intercadeias. Em algumas modalidades, uma região ligantea *scorpion* é derivada de uma região de dobradiça de imunoglobulina ou uma região peduncular de lectina C e compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 111, 113, 115, 117, 119,

30 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 149, 151, 153, 155,

157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 231, 233, 235, 237, 239,
 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263,
 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 287, 289, 297,
 305, 307, 309, 310, 311, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319,
 5 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331,
 346, 351, 352, 353, 354, 373, 374, 375, 376 e 377. Mais
 geralmente, qualquer seqüência de aminoácidos identificada
 na listagem de seqüências como fornecendo uma seqüência
 derivada de uma região de dobradiça é contemplada para uso
 10 como um ligante *scorpion* nas moléculas *scorpion* de acordo
 com a invenção. Além disso, um ligante *scorpion* derivado de
 uma dobradiça de Ig é um domínio de peptídeo dobradiça-like
 que possui pelo menos uma cisteína livre capaz de
 participar em uma ligação dissulfeto intercadeias. De
 15 preferência, um ligante *scorpion* derivado de um peptídeo de
 dobradiça de Ig retém uma cisteína que corresponde à
 cisteína da dobradiça disposta em direção ao terminal N
 daquela dobradiça. De preferência, um ligante *scorpion*
 derivado de uma dobradiça de IgG1 possui uma cisteína ou
 20 possui duas cisteínas que correspondem às cisteínas da
 dobradiça. Adicionalmente, um ligante *scorpion* é uma região
 peduncular de uma molécula de lectina C do Tipo II. Em
 algumas modalidades, um *scorpion* compreende um ligante
scorpion que possui uma seqüência selecionada do grupo que
 25 consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 373-377.

A sub-região constante disposta centralmente é
 derivada de uma região constante de uma proteína de
 imunoglobulina. A sub-região constante geralmente é
 derivada de uma porção C_{H2} de uma região C_H de uma
 30 imunoglobulina no abstrato, embora possa ser derivada de

uma porção $C_{H2}-C_{H3}$. Opcionalmente, a sub-região constante pode ser derivada de uma porção dobradiça- C_{H2} ou dobradiça- $C_{H2}-C_{H3}$ de uma imunoglobulina, colocando um peptídeo que corresponde a um terminal N da região de dobradiça de Ig na

5 sub-região constante e disposta entre a sub-região constante e o domínio de ligação 1. Além disso, porções da sub-região constante podem ser derivadas das regiões C_H de imunoglobulinas diferentes. Além disso, o peptídeo que corresponde a um C_{H3} de Ig pode ser truncado, deixando uma

10 sequência de aminoácidos do terminal C selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 366-371. Prefere-se, no entanto, que, em modalidades nas quais uma dobradiça de *scorpion* é um peptídeo dobradiça-like derivado de uma dobradiça de imunoglobulina, o ligante *scorpion* e a sub-

15 região constante sejam derivados do mesmo tipo de imunoglobulina. A sub-região constante fornece pelo menos uma atividade associada à região C_H de uma imunoglobulina como, por exemplo, citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células (ADCC), citotoxicidade dependente de

20 complemento (CDC), ligação de proteína A, ligação a pelo menos um receptor Fc, estabilidade detectável de forma reprodutível em relação a uma Proteína, de acordo com a invenção, exceto pela ausência de uma sub-região constante e, talvez, transferência placentária quando a transferência

25 por gerações de uma molécula de acordo com a invenção fosse vantajosa, como reconhecido por aqueles habilitados na técnica. Da mesma forma que domínios de ligação descritos acima, a sub-região constante é derivada de pelo menos uma molécula de imunoglobulina, e exibe uma sequência de

30 aminoácidos idêntica ou substancialmente idêntica para uma

região ou regiões de pelo menos uma imunoglobulina. Em algumas modalidades, a sub-região constante é modificada em relação à sequência ou sequências de pelo menos uma imunoglobulina (por substituição de um ou mais aminoácidos ou imino ácidos não nativos convencionais ou não convencionais, por exemplo, sintéticos), resultando em uma estrutura primária que pode gerar uma estrutura secundária ou de ordem mais elevada alterada com propriedades alteradas a ela associadas, ou pode levar a alterações no processamento pós-tradução, por exemplo, glicosilação.

Para aqueles domínios de ligação e sub-regiões constantes que exibem uma sequência de aminoácidos idêntica ou substancialmente idêntica a um ou mais polipeptídeos de imunoglobulina, as modificações pós-tradução da molécula de acordo com a invenção podem resultar em uma molécula modificada em relação à(s) imunoglobulina(s) que serve como base para a modificação. Por exemplo, com a utilização de metodologias conhecidas na técnica, uma célula hospedeira pode ser modificada, por exemplo, uma célula CHO, de uma forma que leva a um padrão alterado de glicosilação de polipeptídeo em relação àquele polipeptídeo em uma célula hospedeira não modificada (por exemplo, CHO).

Fornecido com essas moléculas e os métodos de sua produção recombinante *in vivo*, foram abertas novas avenidas de substâncias diagnósticas e terapêuticas direcionadas para permitir, por exemplo, o recrutamento direcionado de células efectoras do sistema imunológico (por exemplo, linfócitos T citotóxicos, células *natural killer*, e semelhantes) às células, tecidos, agentes e objetos estranhos a serem destruídos ou seqüestrados, por exemplo,

células cancerígenas e agentes infecciosos. Além de localizar células terapêuticas em um local de tratamento, os peptídeos são úteis na localização de compostos terapêuticos como, por exemplo, proteínas marcadas radioativamente. Além disso, os peptídeos também são úteis da depuração de composições deletérias, por exemplo, por associação de uma composição deletéria, por exemplo, uma toxina, com uma célula capaz de destruir ou eliminar aquela toxina (por exemplo, um macrófago). As moléculas da invenção são úteis na modulação da atividade de moléculas parceiras de ligação como, por exemplo, receptores da superfície celular. Isso é mostrado na Figura 17, em que a sinalização apoptótica por meio de CD20 e/ou CD37 é acentuadamente intensificada por uma molécula da presente invenção. O efeito dessa sinalização é a morte da célula-alvo. Doenças e condições nas quais a eliminação de populações de células definidas é benéfica incluiriam doenças infecciosas e parasíticas, condições inflamatórias e autoimunes, malignidades, e semelhantes. Aqueles habilitados na técnica reconheceriam que não há limitação da abordagem para o aumento da sinalização apoptótica. A sinalização mitótica e a sinalização que leva à diferenciação, ativação ou inativação de populações de células definidas podem ser induzidas por moléculas da presente invenção por meio da seleção apropriada de moléculas parceiras de ligação. Considerações adicionais sobre a revelação da invenção serão facilitadas por uma consideração das seguintes definições expressas dos termos aqui utilizados.

Uma "proteína de ligação de cadeia simples" é um

arranjo contíguo simples de aminoácidos ligados de forma covalente, com a cadeia capaz de se ligar especificamente a um ou mais parceiros de ligação que compartilham determinantes suficientes de um sítio de ligação a ser
5 ligado de forma detectável pela proteína de ligação de cadeia simples. Parceiros de ligação exemplares incluem proteínas, carboidratos, lipídeos e pequenas moléculas.

Para facilitar a exposição, "derivados" e "variantes" de proteínas, polipeptídeos e peptídeos de acordo com a
10 invenção são descritos em termos de diferenças das proteínas e/ou polipeptídeos e/ou peptídeos de acordo com a invenção, o que significa que os derivados e variantes, que são proteínas/polipeptídeos/peptídeos de acordo com a invenção, diferem de proteínas, polipeptídeos ou peptídeos
15 não derivatizadas ou não variantes da invenção da forma definida. Aqueles habilitados na técnica compreenderão que os próprios derivados e variantes são proteínas, polipeptídeos e peptídeos de acordo com a invenção.

Um "anticorpo" é usado na definição mais ampla
20 consistente com seu significado na técnica, e inclui proteínas, polipeptídeos e peptídeos capazes de se ligar a pelo menos um parceiro de ligação, por exemplo, um antígeno proteináceo ou não proteináceo. Um "anticorpo", como aqui usado, inclui membros da superfamília das imunoglobulinas
25 de proteínas, de qualquer espécie, de composição de cadeia simples ou múltiplas, e variantes, análogos, derivados e fragmentos dessas moléculas. Especificamente, um "anticorpo" inclui qualquer forma de anticorpo conhecida na técnica, incluindo, sem limitação, anticorpos monoclonais e
30 policlonais, anticorpos quiméricos, anticorpos com enxerto

de CDR, anticorpos humanizados, fragmentos variáveis de cadeia simples, anticorpos biespecíficos, diabodies, fusões de anticorpos, e semelhantes.

Um "domínio de ligação" é uma região do peptídeo, por exemplo, um fragmento de um polipeptídeo derivado de uma imunoglobulina (por exemplo, um anticorpo), que se liga especificamente a um ou mais parceiros de ligação específicos. Caso existam vários parceiros de ligação, aqueles parceiros compartilharão determinantes de ligação suficientes para se ligar de forma detectável ao domínio de ligação. De preferência, o domínio de ligação é uma sequência de aminoácidos contíguos.

Um "epitopo" é aqui usado em seu significado comum de um sítio antigênico único, ou seja, um determinante antigênico, em uma substância (por exemplo, uma proteína), com o qual um anticorpo interage especificamente, por exemplo, por ligação. Outros termos que adquiriram significados bem definidos na técnica das imunoglobulinas (por exemplo, anticorpo), por exemplo, "região variável leve", região variável pesada", "região constante leve", "região constante pesada", "região de dobradiça de anticorpo", "região determinante de complementaridade", "região estrutural", "isótipo de anticorpo", "região Fc", "fragmento variável de cadeia simples" ou "scFv", "diabody", "quimera", "anticorpo com enxerto de CDR", "anticorpo humanizado", "anticorpo modelado", "fusão de anticorpos", e semelhantes, recebem, cada um deles, seus significados bem definidos na técnica, a menos que aqui indicado expressamente de forma diferente.

Termos compreendidos por aqueles habilitados na

técnica como se referindo à tecnologia de anticorpos recebem o significado adquirido na técnica, a menos que aqui indicado expressamente de forma diferente. Exemplos desses termos são " V_L " e " V_H ", que se referem à região de
 5 ligação variável derivada de uma cadeia leve e pesada de anticorpo, respectivamente; e C_L e C_H , que se referem a uma "região constante de imunoglobulina", ou seja, uma região constante derivada de uma cadeia leve ou pesada de anticorpo, respectivamente, com essa última região sendo
 10 ainda divisível em domínios da região constante C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e C_{H4} , dependendo do isótipo de anticorpo (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) do qual a região foi derivada. CDR significa "região determinante de complementaridade". Uma "região de dobradiça" é derivada da seqüência de aminoácidos
 15 interposta entre, e que conecta, as regiões C_{H1} e C_{H2} de uma cadeia simples de um anticorpo, que é conhecida na técnica por fornecer flexibilidade, na forma de uma "dobradiça", aos anticorpos inteiros.

Uma "sub-região constante" é um termo aqui definido
 20 para se referir a uma seqüência de peptídeos, polipeptídeos ou proteínas que corresponde, ou é derivada, de um ou mais domínios da região constante de um anticorpo. Dessa forma, uma sub-região constante pode incluir qualquer um ou todos os seguintes domínios: um domínio C_{H1} , uma região de
 25 dobradiça, um domínio C_{H2} , um domínio C_{H3} (IgA, IgD, IgG, IgE e IgM), e um domínio C_{H4} (IgE, IgM). Portanto, uma sub-região constante, como aqui definida, pode se referir a uma região do polipeptídeo que corresponde a uma região constante inteira de um anticorpo, ou a uma porção desta.
 30 Tipicamente, uma sub-região constante de um polipeptídeo,

ou de ácido nucléico codificador, da invenção possui uma dobradiça, um domínio C_{H2} e um domínio C_{H3} .

Uma "função efetora" é uma função associada ou fornecida por uma região constante de um anticorpo. Funções 5 efetoras exemplares incluem citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células (ADCC), ativação de complemento e citotoxicidade dependente de complemento (CDC), ligação de receptor Fc e meia-vida plasmática aumentada, além de transferência placentária. Uma função 10 efetora de uma Composição, de acordo com a invenção é detectável; preferivelmente, a atividade específica da Composição, de acordo com a invenção para aquela função é aproximadamente a mesma que a atividade específica de um anticorpo do tipo selvagem com relação àquela função 15 efetora, ou seja, a sub-região constante da molécula de ligação multivalente preferivelmente não perdeu nenhuma função efetora em relação a um anticorpo do tipo selvagem.

Um "ligante" é um peptídeo, ou polinucleotídeo, que une ou liga outros peptídeos ou polinucleotídeos. 20 Tipicamente, um peptídeo ligante é um oligopeptídeo de cerca de 2-50 aminoácidos, com ligantees polinucleotídicos típicos que codificam um ligante peptídico desse tipo e, dessa forma, possuem cerca de 6-150 nucleotídeos de comprimento. Ligantees unem o primeiro domínio de ligação a 25 um domínio da sub-região constante. Um ligante peptídico exemplar é $(Gly_4Ser)_3$. Um ligante *scorpion* é usado para unir a extremidade do terminal C de uma sub-região constante a um segundo domínio de ligação. O ligante *scorpion* pode ser derivado de uma região de dobradiça de 30 imunoglobulina ou da região peduncular de uma lectina C do

tipo II, como descrito com mais detalhe abaixo.

Um "alvo" possui mais de um significado, com o contexto da sua utilização definindo um significado não ambíguo em cada caso. Em seu significado mais restrito, um

5 "alvo" é um sítio de ligação, ou seja, o domínio de ligação de um parceiro de ligação para uma composição de peptídeo de acordo com a invenção. Em um sentido mais amplo, "alvo" ou "alvo molecular" refere-se a todo o parceiro de ligação (por exemplo, uma proteína), que necessariamente exibe o

10 sítio de ligação. Cada um dos alvos específicos, por exemplo, "CD20", "CD37", e semelhantes, recebe o significado comum que o termo adquiriu na técnica. Uma "célula-alvo" é qualquer célula procariótica ou eucariótica, seja ela saudável ou doente, que está

15 associada a uma molécula-alvo de acordo com a invenção. Evidentemente, moléculas-alvo também são encontradas não associadas a qualquer célula (ou seja, um alvo sem célula) ou em associação com outras composições como, por exemplo, vírus (incluindo bacteriófago), veículos orgânicos ou

20 inorgânicos de moléculas-alvo, e objetos estranhos.

Exemplos de materiais com os quais uma molécula-alvo pode estar associada incluem células autólogas (por exemplo, células cancerígenas ou outras células doentes), agentes infecciosos (por exemplo, células infecciosas e

25 vírus infecciosos), e semelhantes. Uma molécula-alvo pode estar associada a uma célula enucleada, uma membrana celular, um lipossomo, uma esponja, um gel, uma cápsula, um comprimido, e semelhantes, que podem ser usados para liberar, transportar ou localizar uma molécula-alvo,

30 independentemente do uso destinado (por exemplo, para

tratamento médico, em consequência de um resultado benigno ou não intencional, ou para promover uma ameaça bioterrorista). Os termos "sem células", "sem vírus", "sem veículo", "sem objeto", e semelhantes referem-se às
5 moléculas-alvo que não estão associadas à composição ou material especificado.

"Afinidade de ligação" refere-se à potência da ligação não covalente das composições de peptídeos da invenção e seus parceiros de ligação. De preferência, afinidade de
10 ligação refere-se a uma medida quantitativa da atração entre membros de um par de ligação.

Um "adjuvante" é uma substância que aumenta ou auxilia o efeito funcional de um composto com o qual está em associação, por exemplo, na forma de uma composição
15 farmacêutica que compreende um agente ativo e um adjuvante. Um "excipiente" é uma substância inerte usada como diluente na formulação de uma composição farmacêutica. Um "veículo" é uma substância tipicamente inerte usada para fornecer um veículo para a liberação de uma composição farmacêutica.

20 "Célula hospedeira" refere-se a qualquer célula, procariótica ou eucariótica, na qual se encontra um polinucleotídeo, uma proteína ou um peptídeo de acordo com a invenção.

"Introdução" de um ácido nucléico ou polinucleotídeo
25 em uma célula hospedeira significa permitir a entrada do ácido nucléico ou polinucleotídeo dentro daquela célula por qualquer meio conhecido na técnica, incluindo, sem limitação, precipitações *in vitro* mediadas por um sal e outras formas de transformação de ácido
30 nucléico/polinucleotídeo desnudo ou ácido

nucléico/polinucleotídeo derivado de vetor, infecção mediada por vírus e, opcionalmente, transdução, com ou sem uma molécula auxiliar (*helper*), liberação de projétil balístico, conjugação, e semelhantes.

5 A "incubação" de uma célula hospedeira significa a manutenção daquela célula sob condições ambientais conhecidas na técnica por serem adequadas para certa finalidade, por exemplo, expressão gênica. Essas condições, que incluem temperatura, força iônica, tensão de oxigênio,
10 concentração de dióxido de carbono, composição de nutrientes, e semelhantes, são bem conhecidas na técnica.

O "isolamento" de um composto, por exemplo, uma proteína ou um peptídeo de acordo com a invenção, significa a separação daquele composto de pelo menos um composto
15 distinto com o qual é encontrado associado na natureza, por exemplo, em uma célula hospedeira que expressa o composto a ser isolado, por exemplo, por isolamento de meio de cultura gasto que contém o composto das células hospedeiras crescidas naquele meio.

20 Um "organismo que necessita" é qualquer organismo em risco, ou que sofre de qualquer doença, distúrbio ou condição que seja passível de tratamento ou atenuação com uma Composição, de acordo com a invenção, incluindo, sem limitação, qualquer uma das várias formas de câncer,
25 qualquer uma dentre diversas doenças autoimunes, envenenamento por radiação em decorrência de proteínas marcadas radioativamente, peptídeos e compostos semelhantes, toxinas ingeridas ou produzidas internamente, e semelhantes, como ficará evidente mediante revisão de
30 toda a especificação. De preferência, um organismo que

necessita de tratamento é um paciente humano.

"Melhora" de um sintoma de uma doença significa a redução de forma detectável da gravidade daquele sintoma da doença, como seria conhecido na técnica. Sintomas
5 exemplares incluem dor, calor, edema e rigidez articular.

A menos que claramente definido pelo contexto, os termos "proteína", "peptídeo" e "polipeptídeo" são aqui utilizados de forma intercambiável, com cada um se referindo a pelo menos uma cadeia contígua de aminoácidos.
10 De forma análoga, os termos "polinucleotídeo", "ácido nucléico" e "molécula de ácido nucléico" são utilizados de forma intercambiável, a menos que claramente definido pelo contexto que se deseje um significado particular e não intercambiável.

15 O termo "sal farmacêuticamente aceitável" refere-se aos sais dos compostos da presente invenção derivados da combinação desses compostos e um ácido orgânico ou inorgânico (sais de adição ácida) ou uma base orgânica ou inorgânica (sais de adição básica).

20 Utilizando-se os termos definidos acima, será apresentada a seguir uma descrição geral dos vários aspectos da invenção. Após a descrição geral, serão apresentados exemplos de trabalho para fornecer evidências suplementares da operabilidade e utilidade da invenção aqui
25 revelada.

Proteínas e polipeptídeos

Em certas modalidades da invenção, são fornecidas quaisquer das proteínas de ligação multivalentes com função efetora aqui descritas, incluindo proteínas de fusão
30 domínio de ligação-imunoglobulina, em que a proteína ou

peptídeo de ligação multivalente com função efetora compreende duas ou mais seqüências de polipeptídeos do domínio de ligação. Cada uma das seqüências de polipeptídeos do domínio de ligação é capaz de se ligar ou
5 se ligar especificamente a um alvo(s), por exemplo, um antígeno(s), cujo alvo(s) ou antígeno(s) pode ser igual ou pode ser diferente. A seqüência de polipeptídeos do domínio de ligação pode ser derivada de uma região variável do antígeno ou pode ser derivada de moléculas imunoglobulina-
10 like, por exemplo, receptores que se dobram em formas que simulam moléculas de imunoglobulina. Os anticorpos dos quais os domínios de ligação são derivados podem ser anticorpos que são policlonais, incluindo anticorpos policlonais monoespecíficos, monoclonais (mAbs),
15 recombinantes, quiméricos, humanizados (por exemplo, com enxerto de CDR), humanos, de cadeia simples, catalíticos, e qualquer outra forma de anticorpo conhecida na técnica, além de fragmentos, variantes ou derivados destes. Em algumas modalidades, cada um dos domínios de ligação da
20 Proteína, de acordo com a invenção é derivado de uma região variável completa de uma imunoglobulina. Em modalidades preferidas, cada um dos domínios de ligação é baseado em uma região variável de Ig humana. Em outras modalidades, a proteína é derivada de um fragmento de uma região variável
25 de Ig. Nessas modalidades, prefere-se que cada seqüência de polipeptídeos do domínio de ligação corresponda às seqüências de cada uma das regiões determinantes de complementaridade de certa região variável de Ig. Também são contemplados dentro da invenção domínios de ligação que
30 correspondem a menos do que todas as CDRs de certa região

variável de Ig, desde que esses domínios de ligação retenham a capacidade de se ligar especificamente a pelo menos um alvo.

A proteína de ligação multivalente com função efetora
5 também possui uma seqüência da sub-região constante derivada de uma região constante de imunoglobulina, preferivelmente uma região constante da cadeia pesada de anticorpo, justaposta covalentemente entre os dois domínios de ligação na proteína de ligação multivalente com função
10 efetora.

A proteína de ligação multivalente com função efetora também possui um ligante *scorpion* que une a extremidade do terminal C da sub-região constante à extremidade do terminal N do domínio de ligação 2. O ligante *scorpion* não
15 é um peptídeo helicoidal, e pode ser derivado de uma região de dobradiça de anticorpo, de uma região que conecta domínios de ligação de uma imunoglobulina, ou da região peduncular de lectinas C do tipo II. O ligante *scorpion* pode ser derivado de uma região de dobradiça do tipo
20 selvagem de uma imunoglobulina, por exemplo, uma região de dobradiça de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD ou IgE. Em outras modalidades, a invenção fornece proteínas de ligação multivalentes com dobradiças alteradas. Uma categoria de regiões de dobradiça alteradas adequadas à inclusão nas
25 proteínas de ligação multivalentes é a categoria de dobradiças com um número alterado de resíduos de cisteína, particularmente aqueles resíduos Cys conhecidos na técnica como estando envolvidos na formação de ligação dissulfeto intercadeias em moléculas de contrapartida de
30 imunoglobulina que possuem dobradiças do tipo selvagem.

Dessa forma, as proteínas podem ter uma dobradiça de IgG1 na qual um dos três resíduos Cys capazes de participar nas formações de ligação dissulfeto intercadeias esteja ausente. Para indicar a subestrutura de cisteína de dobradiças alteradas, a subsequência Cys é apresentada do terminal N para o terminal C. Utilizando-se esse sistema de identificação, as proteínas de ligação multivalentes com dobradiças de IgG alteradas incluem estruturas de dobradiça caracterizadas como cxc, xxc, ccx, xxc, xcx, cxx e xxx. O resíduo Cys pode tanto ser eliminado quanto substituído por um aminoácido que produza uma substituição conservadora ou uma substituição não conservadora. Em algumas modalidades, a cisteína é substituída por uma serina. Para proteínas com ligantees *scorpion* que compreendem dobradiças de IgG1, o número de cisteínas que corresponde às cisteínas da dobradiça é reduzido a 1 ou 2, preferivelmente com uma daquelas cisteínas que correspondem à cisteína da dobradiça disposta mais próxima ao terminal N da dobradiça.

Para proteínas com ligantees *scorpion* que compreendem dobradiças de IgG2, pode haver 0, 1, 2, 3 ou 4 resíduos Cys. Para ligantees *scorpion* que compreendem dobradiças de IgG2 alteradas que contêm 1, 2 ou 3 resíduos Cys, todos os subconjuntos possíveis de resíduos Cys são contemplados. Dessa forma, para ligantees que possuem uma Cys, as proteínas de ligação multivalentes podem ter o seguinte motivo Cys na região de dobradiça: cxxx, xcxx, xxcx ou xxxc. Para ligantees *scorpion* que compreendem variantes de dobradiça de IgG2 que possuem 2 ou 3 resíduos Cys, todas as combinações possíveis de resíduos Cys retidos e substituídos (ou eliminados) são contempladas. Para

proteínas de ligação multivalentes com ligantees *scorpion* que compreendem regiões de dobradiça IgG3 alteradas ou regiões de dobradiça IgG4 alteradas, uma redução nos resíduos Cys de 1 para menos do que o número completo de
5 resíduos Cys na região de dobradiça é contemplada, independentemente de se a perda ocorre por eliminação ou substituição de aminoácidos conservadora ou não conservadora (por exemplo, serina). De forma similar, proteínas de ligação multivalentes que possuem um ligante
10 *scorpion* que compreende uma dobradiça de IgA, IgD ou IgE do tipo selvagem são contempladas, bem como regiões de dobradiça alteradas correspondentes que possuem um número reduzido de resíduos Cys que se estende de 0 a um a menos do que o número total de resíduos Cys encontrados na
15 dobradiça do tipo selvagem correspondente. Em algumas modalidades que possuem uma dobradiça de IgG1, o primeiro resíduo Cys, ou do terminal N, da dobradiça é retido. Para proteínas com regiões de dobradiça do tipo selvagem ou alteradas, é contemplado que as proteínas de ligação
20 multivalentes serão moléculas de cadeia simples capazes de formar homomultímeros, tais como dímeros, por exemplo, por formação de ligação dissulfeto. Além disso, proteínas com dobradiças alteradas podem ter alterações nos terminais da região de dobradiça, por exemplo, perda ou substituição de
25 um ou mais resíduos de aminoácidos no terminal N, no terminal C ou em ambos os terminais de certa região ou domínio, por exemplo, um domínio de dobradiça, como aqui revelado.

Em outra modalidade exemplar, a sub-região constante é
30 derivada de uma região constante que compreende uma região

de dobradiça de IgD nativa ou projetada. A dobradiça de IgD humana do tipo selvagem possui uma cisteína que forma uma ligação dissulfeto com a cadeia leve na estrutura nativa da IgD. Em algumas modalidades, essa cisteína da dobradiça de
5 IgD é mutada (por exemplo, eliminada) para gerar uma dobradiça alterada para uso como uma região de conexão entre domínios de ligação de, por exemplo, uma molécula biespecífica. Outras mudanças ou eliminações ou alterações de aminoácidos em uma dobradiça de IgD que não resultem em
10 inflexibilidade indesejada da dobradiça estão dentro do escopo da invenção. Regiões de dobradiça de IgD nativas ou projetadas de outras espécies também estão incluídas dentro do escopo da invenção, bem como dobradiças de IgD humanizada nativas ou projetadas de espécies não humanas, e
15 regiões de dobradiça (diferentes de IgD) de outros isótipos de anticorpos humanos ou não humanos (por exemplo, a dobradiça de IgG2 de lhama).

A invenção ainda compreende sub-regiões constantes anexadas aos ligantes *scorpion* que podem ser derivadas de
20 dobradiças que correspondem a uma região de dobradiça conhecida, por exemplo, uma dobradiça de IgG1 ou uma dobradiça de IgD, como observado acima. A sub-região constante pode conter uma região de dobradiça modificada ou alterada (em relação à do tipo selvagem) na qual pelo menos
25 um resíduo de cisteína que sabidamente participa na ligação dissulfeto intercadeias é substituído por outro aminoácido em uma substituição conservadora (por exemplo, Ser para Cys) ou uma substituição não conservadora. A sub-região constante não inclui uma região do peptídeo ou domínio que
30 corresponde a um domínio C_{H1} de imunoglobulina.

Sequências alternativas de dobradiça e liganteas que podem ser usadas como regiões de conexão são de porções de receptores da superfície celular que conectam domínios *V-like* de imunoglobulina ou domínios *C-like* de imunoglobulina. Regiões entre domínios *V-like* de Ig nos quais o receptor da superfície celular contém múltiplos domínios *V-like* de Ig em tandem, e entre domínios *C-like* de Ig nos quais o receptor da superfície celular contém múltiplas regiões de *C-like* em tandem de Ig, também são contempladas como regiões de conexão. Sequências de dobradiça e liganteas possuem comprimento tipicamente de 5 a 60 aminoácidos, e podem ser primariamente flexíveis, mas também podem fornecer características mais rígidas. Além disso, ligantees freqüentemente fornecem um espaçamento que facilita a minimização do impedimento estérico entre os domínios de ligação. De preferência, esses peptídeos de dobradiças e ligantees possuem estrutura primariamente de hélice α , com mínima estrutura de β -sheet. As sequências preferidas são estáveis no plasma e soro, e são resistentes à clivagem proteolítica. As sequências preferidas podem conter um motivo de ocorrência natural ou adicionado como, por exemplo, o motivo de CPPC que confere uma ligação dissulfeto para estabilizar a formação de dímero. As sequências preferidas podem conter um ou mais sítios de glicosilação. Exemplos de sequências de dobradiça e liganteas preferidas incluem, sem limitação, as regiões interdomínios entre as regiões *V-like* e Ig *C-like* de Ig de CD2, CD4, CD22, CD33, CD48, CD58, CD66, CD80, CD86, CD150, CD166 e CD244.

A sub-região constante pode ser derivada de uma região

constante de camelídeo como, por exemplo, uma IgG2 ou IgG3 de lhama ou de camelo.

É especificamente contemplada uma sub-região constante que possui a região $C_{H2}-C_{H3}$ de qualquer classe de Ig, ou de qualquer subclasse de IgG, por exemplo, IgG1 (por exemplo, IgG1 humana). Em modalidades preferidas, a sub-região constante e o ligante *scorpion* derivado de uma dobradiça de imunoglobulina são, ambos, derivados da mesma classe de Ig. Em outras modalidades preferidas, a sub-região constante e o ligante *scorpion* derivado de uma dobradiça de imunoglobulina são, ambos, derivados da mesma subclasse de Ig. A sub-região constante também pode ser um domínio C_{H3} de qualquer classe ou subclasse de Ig, por exemplo, IgG1 (por exemplo, IgG1 humana), desde que esteja associada a pelo menos uma função efetora de imunoglobulina.

A sub-região constante não corresponde a uma região constante de imunoglobulina completa (ou seja, C_{H1} -dobradiça- $C_{H2}-C_{H3}$) da classe de IgG. A sub-região constante pode corresponder a uma região constante de imunoglobulina completa de outras classes. Domínios constantes de IgA, por exemplo, uma dobradiça de IgA1, uma dobradiça de IgA2, domínios C_{H2} de uma IgA e domínios C_{H3} de uma IgA com um apêndice mutado ou ausente, também são contemplados como sub-regiões constantes. Além disso, qualquer domínio constante de cadeia leve pode funcionar como uma sub-região constante, por exemplo, C_L ou qualquer C_L . A sub-região constante também pode incluir JH ou JK, com ou sem uma dobradiça. A sub-região constante também pode corresponder a anticorpos projetados nos quais, por exemplo, um enxerto de alça foi construído efetuando-se substituições de

aminoácidos selecionadas usando a estrutura central de uma IgG para gerar um sítio de ligação para um receptor diferente de um FcR natural (CD16, CD32, CD64, FcεR1), como seria entendido na técnica. Qualquer sub-região constante
5 exemplar desse tipo é uma região C_{H2}-C_{H3} de IgG modificada para ter um sítio de ligação de CD89.

Esse aspecto da invenção fornece uma proteína ou um peptídeo de ligação multivalente que possui função efetora, que compreende, que consiste basicamente em ou que consiste
10 em: (a) uma sequência de polipeptídeos do domínio de ligação disposta no terminal N derivada de uma imunoglobulina que está fundida ou de algum outro modo conectada a (b) uma sequência de polipeptídeos da sub-região constante derivada de uma região constante de
15 imunoglobulina, que preferivelmente inclui uma sequência da região de dobradiça, em que o polipeptídeo da região de dobradiça pode ser como aqui descrito, e pode compreender, consistir basicamente em, ou consistir em, por exemplo, uma
20 sequência de polipeptídeos alternativa da região de dobradiça, por sua vez fundida ou de algum outro modo conectada a (c) uma segunda sequência de polipeptídeos do domínio de ligação disposta no terminal C nativa ou projetada derivada de uma imunoglobulina.

A sequência de polipeptídeos da sub-região constante
25 disposta centralmente derivada de uma região constante de imunoglobulina é capaz de pelo menos uma atividade imunológica selecionada do grupo que consiste em citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos, CDC, fixação de complemento e ligação de
30 receptor Fc, e cada um dos polipeptídeos do domínio de

ligação é capaz de se ligar ou se ligar especificamente a um alvo, por exemplo, um antígeno, em que os alvos podem ser iguais ou diferentes, e podem ser encontrados efetivamente no mesmo ambiente fisiológico (por exemplo, a 5 superfície da mesma célula) ou em ambientes diferentes (por exemplo, superfícies celulares diferentes, em uma localização na superfície celular e uma localização fora da célula, por exemplo, em solução).

Esse aspecto da invenção também compreende proteínas 10 ou polipeptídeos variantes que exibem uma função efetora que são pelo menos 80% e, de preferência, 85%, 90%, 95% ou 99% idênticos a uma proteína multivalente com função efetora de sequência específica, como aqui revelada.

Polinucleotídeos

15 A invenção também fornece polinucleotídeos (polinucleotídeos isolados ou purificados ou puros) que codificam as proteínas ou peptídeos de acordo com a invenção, vetores (incluindo vetores de clonagem e vetores de expressão) que compreendem esses polinucleotídeos, e 20 células (por exemplo, células hospedeiras) transformadas ou transfectadas com um polinucleotídeo ou vetor de acordo com a invenção. Na codificação das proteínas ou dos polipeptídeos da invenção, os polinucleotídeos codificam um primeiro domínio de ligação, um segundo domínio de ligação 25 e um domínio F_c , todos derivados de imunoglobulinas, preferivelmente imunoglobulinas humanas. Cada domínio de ligação pode conter uma sequência que corresponde a uma sequência da região variável de comprimento total (cadeia pesada e/ou cadeia leve), ou a uma sequência parcial desta, 30 desde que cada um desses domínios de ligação retenha a

capacidade para se ligar especificamente. O domínio F_c pode ter uma sequência que corresponde a uma sequência do domínio F_c de imunoglobulina de comprimento total ou a uma sequência parcial desta, desde que o domínio F_c exiba pelo menos uma função efetora, como aqui definida. Além disso, cada um dos domínios de ligação pode estar unido ao domínio F_c por meio de um ligante peptídico que tipicamente possui pelo menos 8 e, de preferência, pelo menos 13 aminoácidos de comprimento. Uma sequência ligantea preferida é uma sequência com base no motivo Gly_4Ser , por exemplo, $(Gly_4Ser)_3$.

Variantes da proteína de ligação multivalente com função efetora também são englobadas pela invenção. Polinucleotídeos variantes são pelo menos 90% e, de preferência, 95%, 99% ou 99,9% idênticos a um dos polinucleotídeos de sequência definida como aqui descrito, ou que hibridiza para um daqueles polinucleotídeos de sequência definida sob condições de hibridização rigorosas de cloreto de sódio 0,015 M, citrato de sódio 0,0015 M a 65-68°C ou cloreto de sódio 0,015 M, citrato de sódio 0,0015 M e formamida 50% a 42°C. As variantes de polinucleotídeo retêm a capacidade para codificar uma proteína de ligação multivalente com função efetora.

O termo "rigoroso" é usado para se referir às condições que são normalmente compreendidas na técnica como rigorosas. O rigor da hibridização é determinado principalmente pela temperatura, força iônica e pela concentração de agentes desnaturantes como, por exemplo, formamida. Exemplos de condições rigorosas para hibridização e lavagem são cloreto de sódio 0,015 M,

citrato de sódio 0,0015 M a 65-68°C ou cloreto de sódio 0,015 M, citrato de sódio 0,0015 M e formamida 50% a 42°C. Veja Sambrook e cols., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989).

Condições mais rigorosas (por exemplo, temperatura maior, força iônica menor, formamida mais elevada ou outro agente desnaturante) também podem ser usadas; no entanto, a taxa de hibridização será afetada. Em casos relacionados à hibridização de desoxioligonucleotídeos, condições de hibridização rigorosas exemplares adicionais incluem lavagem em 6x SSC, pirofosfato de sódio 0,05% a 37°C (para oligonucleotídeos de 14 bases), 48°C (para oligonucleotídeos de 17 bases), 55°C (para oligonucleotídeos de 20 bases) e 60°C (para oligonucleotídeos de 23 bases).

Em um aspecto relacionado da invenção, é fornecido um método de produção de um polipeptídeo ou proteína ou de outra construção da invenção, por exemplo, incluindo uma proteína ou um peptídeo de ligação multivalente que possui função efetora, que compreende as etapas de: (a) cultura de uma célula hospedeira, como aqui descrita ou fornecida, sob condições que permitem a expressão da construção; e (b) isolamento do produto de expressão, por exemplo, a proteína ou o peptídeo de ligação multivalente com função efetora da célula hospedeira ou da cultura da célula hospedeira.

Construções

A presente invenção também está relacionada a vetores, e construções preparadas a partir de vetores conhecidos, cada um incluindo um polinucleotídeo ou ácido nucléico da

invenção e, em particular, às construções de expressão recombinante, incluindo qualquer uma das várias construções conhecidas, incluindo construções de liberação, úteis para terapia gênica, que incluem quaisquer ácidos nucleicos que
5 codificam proteínas de ligação e polipeptídeos com função efetora multivalentes, por exemplo, multiespecíficos, incluindo biespecíficos, como aqui fornecidos; às células hospedeiras que são projetadas geneticamente com vetores e/ou outras construções da invenção, e aos métodos de
10 administração de construções de expressão ou outras construções que compreendem seqüências de ácidos nucleicos que codificam proteínas de ligação multivalentes, por exemplo, multiespecíficas, incluindo biespecíficas, com função efetora, ou fragmentos ou variantes destas, por
15 técnicas recombinantes.

Várias construções da invenção, incluindo proteínas de ligação multivalentes, por exemplo, multiespecíficas, com função efetora, podem ser expressas em praticamente qualquer célula hospedeira, incluindo células hospedeiras
20 *in vivo*, no caso de uso para terapia gênica, sob o controle de promotores apropriados, dependendo da natureza da construção (por exemplo, tipo de promotor, como descrito acima), e da natureza da célula hospedeira desejada (por exemplo, pós-mitótica terminalmente diferenciada ou em
25 divisão ativa; por exemplo, manutenção de uma construção passível de expressão como um epissoma ou integrada no genoma da célula hospedeira).

Vetores de clonagem e de expressão apropriados para uso com hospedeiros eucarióticos e procarióticos são
30 descritos, por exemplo, em Sambrook, e cols., "Molecular

Cloning: A Laboratory Manual", Segunda Edição, Cold Spring Harbor, NY, (1989). Vetores de clonagem/expressão exemplares incluem, sem limitação, vetores de clonagem, vetores *shuttle* e construções de expressão, que podem ser

5 baseados em plasmídeos, fagomídeos, fasmídeos, cosmídeos, vírus, cromossomos artificiais, ou qualquer veículo de ácido nucléico adequado à amplificação, transferência e/ou expressão de um polinucleotídeo nele contido que é conhecido na técnica. Como aqui observado, em modalidades

10 preferidas da invenção, a expressão recombinante é efetuada em células mamíferas que foram transfectadas, transformadas ou transduzidas com um ácido nucléico de acordo com a invenção. Veja também, por exemplo, Machida, C.A., "Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols"; Wolff,

15 J.A., "Gene Therapeutics: Methods and Applications of Direct Gene Transfer" (Birkhauser 1994); Stein, U. e Walther, W. (eds., "Gene Therapy of Cancer: Methods and Protocols" Humana Press 2000); Robbins, P.D. (ed.), "Gene Therapy Protocols" (Humana Press 1997); Morgan, J.R. (ed.),

20 "Gene Therapy Protocols" (Humana Press 2002); Meager, A. (ed.), "Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations: From Laboratory to Clinic" (John Wiley & Sons Inc. 1999); MacHida, C.A. e Constant, J.G., "Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols" (Humana Press

25 2002); "New Methods Of Gene Therapy For Genetic Metabolic Diseases NIH Guide", Volume 22, Número 35, 1º de outubro de 1993. Veja também as Patentes U.S. N^{os} 6.384.210, 6.384.203, 6.384.202, 6.384.018, 6.383.814, 6.383.811, 6.383.795, 6.383.794, 6.383.785, 6.383.753, 6.383.746,

30 6.383.743, 6.383.738, 6.383.737, 6.383.733, 6.383.522,

6.383.512, 6.383.481, 6.383.478, 6.383.138, 6.380.382,
6.380.371, 6.380.369, 6.380.362, 6.380.170, 6.380.169,
6.379.967 e 6.379.966.

Tipicamente, as construções de expressão são derivadas
5 de vetores de plasmídeo. Uma construção preferida é um
vetor pNASS modificado (Clontech, Palo Alto, CA), que
possui seqüências de ácidos nucleicos que codificam um gene
de resistência à ampicilina, um sinal de poliadenilação e
um sítio do promotor T7. Outros vetores mamíferos de
10 expressão adequados são bem conhecidos (veja, por exemplo,
Ausubel e cols., 1995; Sambrook e cols., supra; veja
também, por exemplo, catálogos de Invitrogen, San Diego,
CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJ). Podem
ser preparadas construções atualmente preferidas que
15 incluem uma seqüência que codifica diidrofolato redutase
(DHFR) sob controle regulador adequado, para a promoção de
níveis de produção aumentados da proteína de ligação
multivalente com função efetora, cujos níveis resultam de
amplificação gênica após aplicação de um agente de seleção
20 apropriado (por exemplo, metotrexato).

Geralmente, vetores de expressão recombinante
incluirão origens de replicação e marcadores selecionáveis
que permitem a transformação da célula hospedeira, e um
promotor derivado de um gene altamente expresso para
25 dirigir a transcrição de uma seqüência estrutural abaixo,
como descrito acima. Um vetor em ligação operacional com um
polinucleotídeo de acordo com a invenção gera uma
construção de clonagem ou expressão. Construções de
clonagem/expressão exemplares contêm pelo menos um elemento
30 de controle de expressão, por exemplo, um promotor, ligado

operacionalmente a um polinucleotídeo da invenção. Elementos de controle de expressão adicionais como, por exemplo, intensificadores, sítios de ligação fator-específicos, finalizadores e sítios de ligação de ribossomo
5 também são contemplados nos vetores e construções de clonagem/expressão de acordo com a invenção. A sequência estrutural heteróloga do polinucleotídeo de acordo com a invenção é montada na fase apropriada com seqüências de iniciação e terminação da tradução. Dessa forma, por
10 exemplo, os ácidos nucléicos que codificam a proteína de ligação multivalente como aqui fornecida podem ser incluídos em qualquer uma dentre diversas construções de vetor de expressão como uma construção de expressão recombinante para a expressão de uma proteína desse tipo em
15 uma célula hospedeira. Em certas modalidades preferidas, as construções são incluídas em formulações que são administradas *in vivo*. Esses vetores e construções incluem seqüências de DNA cromossômicas, não cromossômicas e sintéticas, por exemplo, derivados de SV40; plasmídeos
20 bacterianos; DNA de fago; plasmídeos de levedura; vetores derivados de combinações de plasmídeos e DNA de fago, DNA viral, por exemplo, do vírus da vacínia, de adenovírus, da boubá aviária e da pseudorraiva, ou retrovírus com replicação deficiente, como descrito abaixo. No entanto,
25 qualquer outro vetor pode ser usado para a preparação de uma construção de expressão recombinante e, em modalidades preferidas, um desse tipo será replicável e viável no hospedeiro.

As seqüências de DNA apropriadas podem ser inseridas
30 em um vetor, por exemplo, por diversos procedimentos. Em

geral, uma sequência de DNA é inserida em um sítio de clivagem de endonuclease de restrição apropriado por procedimentos conhecidos na técnica. São contempladas técnicas padronizadas para clonagem, isolamento, 5 amplificação e purificação de DNA, para reações enzimáticas que envolvem DNA ligase, DNA polimerase, endonucleases de restrição, e semelhantes, e várias técnicas de separação. Várias técnicas padronizadas são descritas, por exemplo, em Ausubel e cols. (1993 "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook e cols. (1989 "Molecular Cloning", Segunda Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis e cols. (1982 "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Glover (Ed.) 10 (1985 "DNA Cloning" Vol. I e II, IRL Press, Oxford, UK); Hames e Higgins (Eds.), (1985 "Nucleic Acid Hybridization", IRL Press, Oxford, UK); e em outros.

A sequência de DNA no vetor de expressão está ligada operacionalmente a pelo menos uma sequência de controle de 20 expressão apropriada (por exemplo, um promotor constitutivo ou um promotor regulado) para dirigir a síntese de mRNA. Exemplos representativos dessas sequências de controle de expressão incluem promotores de células eucarióticas ou seus vírus, como descrito acima. Regiões promotoras podem 25 ser selecionadas de qualquer gene desejado com o uso de vetores CAT (cloranfenicol transferase) ou de outros vetores com marcadores selecionáveis. Promotores eucarióticos incluem promotores de CMV imediatos iniciais, de timidina quinase de HSV, de SV40 inicial e tardio, LTRs 30 de retrovírus e metalotioneína-I de camundongo. A seleção

do vetor e do promotor apropriados é do conhecimento daqueles habilitados na técnica, e a preparação de certas construções de expressão recombinante particularmente preferidas que compreendem pelo menos um promotor ou
5 promotor regulado ligado operacionalmente a um ácido nucléico que codifica uma proteína ou polipeptídeo de acordo com a invenção é aqui descrita.

A transcrição do DNA que codifica proteínas e polipeptídeos da invenção por eucariotas superiores pode
10 ser aumentada por inserção de uma sequência intensificadora no vetor. Exemplos incluem o intensificador de SV40 no lado tardio da origem de replicação bp 100 a 270, um intensificador do promotor inicial de citomegalovírus, o intensificador de polioma no lado tardio da origem de
15 replicação e intensificadores de adenovírus.

Terapias gênicas que utilizam os ácidos nucléicos da invenção também são contempladas, compreendendo estratégias para a substituição de genes defeituosos ou a adição de novos genes às células e/ou tecidos, e estão sendo
20 desenvolvidas para aplicação no tratamento de câncer, na correção de distúrbios metabólicos e no campo de imunoterapia. As terapias gênicas da invenção incluem o uso de várias construções da invenção, com ou sem um veículo ou veículo de liberação ou construções separadas, para o
25 tratamento das doenças, distúrbios e/ou condições aqui observados. Essas construções também podem ser usadas como vacinas para tratamento ou prevenção das doenças, distúrbios e/ou condições aqui observados. Vacinas de DNA, por exemplo, utilizam os polinucleotídeos que codificam
30 determinantes imunogênicos de proteína e ácido nucléico

para estimular o sistema imunológico contra patógenos ou células tumorais. Essas estratégias podem estimular imunidade adquirida ou inata, ou podem envolver a modificação da função imune por meio da expressão de citocina. A terapia gênica *in vivo* envolve a injeção direta de material genético em um paciente ou animal, tipicamente para tratar, evitar ou atenuar uma doença ou sintomas associados a uma doença. Vacinas e modulação imune são terapias sistêmicas. Com terapias tecido-específicas *in vivo*, por exemplo, aquelas destinadas ao tratamento de câncer, liberação gênica localizada e/ou sistemas de expressão/direcionamento são preferidos. Diversos vetores de terapia gênica que têm como alvo tecidos específicos são conhecidos na técnica, e foram desenvolvidos procedimentos para se dirigir fisicamente a tecidos específicos, por exemplo, com o uso de tecnologias baseadas em cateter, todas as quais são aqui contempladas.

Abordagens *ex vivo* para terapia gênica também são aqui contempladas, e envolvem a remoção, modificação genética, expansão e re-administração das próprias células de um indivíduo, por exemplo, de um paciente humano. Exemplos incluem transplante de medula óssea para o tratamento de câncer ou a modificação genética de células progenitoras linfóides. A terapia gênica *ex vivo* é aplicada preferivelmente ao tratamento de células que são facilmente acessíveis, e que podem sobreviver em cultura durante o processo de transferência gênica (por exemplo, células sanguíneas ou da pele).

Vetores de terapia gênica úteis incluem vetores adenovirais, vetores lentivirais, vetores de vírus adeno-

associado (AAV), vetores do vírus do herpes simples (HSV), e vetores retrovirais. Terapias gênicas também podem ser realizadas com o uso de "DNA desnudo", liberação baseada em lipossomos, liberação baseada em lipídeos (incluindo DNA
5 anexado a lipídeos carregados positivamente), eletroporação e projeção balística.

Em certas modalidades, incluindo, sem limitação, modalidades de terapia gênica, o vetor pode ser um vetor viral como, por exemplo, um vetor retroviral (Miller e
10 cols., 1989 *BioTechniques* 7:980; Coffin e Varmus, 1996 "Retrovirus", Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY). Por exemplo, retrovírus dos quais os vetores de plasmídeo retroviral podem ser derivados incluem, sem limitação, vírus da leucemia murídea de Moloney, vírus da necrose
15 esplênica, retrovírus como, por exemplo, vírus do sarcoma de Rous, vírus do sarcoma de Harvey, vírus da leucose aviária, vírus da leucemia do macaco gibão, vírus da imunodeficiência humana, adenovírus, vírus do sarcoma mieloproliferativo e vírus do tumor mamário.

20 Retrovírus são vírus de RNA que podem replicar e se integrar no genoma de uma célula hospedeira por meio de um intermediário de DNA. O intermediário de DNA, ou pró-vírus, pode ser integrado de forma estável no DNA da célula hospedeira. De acordo com certas modalidades da presente
25 invenção, uma construção de expressão pode compreender um retrovírus no qual um gene estranho que codifica uma proteína estanha é incorporado no lugar do RNA retroviral normal. Quando o RNA retroviral entra em uma célula hospedeira coincidente com infecção, o gene estranho também
30 é introduzido na célula, e pode então ser integrado no DNA

da célula hospedeira como se fosse parte do genoma retroviral. A expressão desse gene estranho dentro do hospedeiro resulta na expressão da proteína estanha.

A maioria dos sistemas de vetor retroviral que foram desenvolvidos para terapia gênica se baseia em retrovírus murídeos. Esses retrovírus existem em duas formas, como partículas virais livres denominadas vírions, ou como pró-vírus integrados no DNA da célula hospedeira. A forma de vírion do vírus contém as proteínas estruturais e enzimáticas do retrovírus (incluindo a enzima transcriptase reversa), duas cópias de RNA do genoma viral, e porções da membrana plasmática da célula fonte que contém glicoproteína do envelope viral. O genoma retroviral é organizado em quatro regiões principais: a Repetição Longa Terminal (LTR), que contém elementos cis-atuantes necessários para a iniciação e terminação da transcrição e é situada tanto 5' quanto 3' em relação aos genes codificadores, e os três genes que codificam *gag*, *pol* e *env*. Esses três genes, *gag*, *pol* e *env*, codificam, respectivamente, estruturas virais internas, proteínas enzimáticas (por exemplo, integrase) e a glicoproteína do envelope (designada gp70 e p15e) que confere a infectividade e especificidade de hospedeiros do vírus, além do peptídeo "R" de função indeterminada.

Foram desenvolvidas linhagens de células de empacotamento (*packaging cells*) e linhagens de células produtoras de vetor separadas em função de questões de segurança em relação aos usos de retrovírus, incluindo usos em construções de expressão. Resumidamente, essa metodologia emprega o uso de dois componentes, um vetor

retroviral e uma linhagem de células de empacotamento (PCL). O vetor retroviral contém repetições longas terminais (LTRs), o DNA estranho a ser transferido, e uma sequência de empacotamento (ψ). Esse vetor retroviral não
5 irá se reproduzir por si próprio porque os genes que codificam proteínas estruturais e do envelope não estão incluídos dentro do genoma do vetor. A PCL contém genes que codificam as proteínas *gag*, *pol* e *env*, mas não contém o sinal de empacotamento " ψ ". Dessa forma, a própria PCL só
10 pode formar partículas de vírion vazias. Dentro desse método geral, o vetor retroviral é introduzido na PCL, criando, dessa forma, uma linhagem de células produtoras de vetor (VCL). Essa VCL fabrica partículas de vírion que contêm apenas o genoma estranho do vetor retroviral e,
15 portanto, foi considerada anteriormente como sendo um vetor retroviral seguro para uso terapêutico.

Uma "construção de vetor retroviral" refere-se a uma montagem que é, dentro de modalidades preferidas da invenção, capaz de dirigir a expressão de uma(s)
20 sequência(s) ou gene(s) de interesse, por exemplo, sequências de ácidos nucleicos que codificam uma proteína de ligação multivalente. Resumidamente, a construção de vetor retroviral deve incluir uma LTR 5', um sítio de ligação de tRNA, um sinal de empacotamento, uma origem de
25 síntese de DNA de segunda fita e uma LTR 3'. Pode ser incluída uma ampla gama de sequências heterólogas dentro da construção de vetor, incluindo, por exemplo, sequências que codificam uma proteína (por exemplo, proteína citotóxica, antígeno associado a doenças, molécula imune acessória ou
30 gene de substituição), ou que são, elas próprias, úteis

como uma molécula (por exemplo, como uma seqüência de ribozima ou anti-senso).

As construções de vetor retroviral da presente invenção podem ser prontamente construídas a partir de uma
5 ampla gama de retrovírus, incluindo, por exemplo, retrovírus do tipo B, C e D, além de espumavírus e lentivírus (veja, por exemplo, "RNA Tumor Viruses", Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985). Esses retrovírus podem ser prontamente obtidos a partir de
10 depósitos ou coleções como, por exemplo, a "American Type Culture Collection" ("ATCC"; Rockville, Maryland), ou isolados de fontes conhecidas com o uso de técnicas comumente disponíveis. Qualquer um dos retrovírus acima pode ser prontamente utilizado a fim de montar ou construir
15 construções de vetor retroviral, células de empacotamento ou células produtoras da invenção, considerando a revelação aqui fornecida e técnicas recombinantes padronizadas (por exemplo, Sambrook e cols., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Kunkle, 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 488).

Promotores adequados para uso em vetores virais geralmente podem incluir, sem limitação, a LTR retroviral; o promotor de SV40; e o promotor do citomegalovírus humano (CMV) descrito em Miller, e cols., 1989 *Biotechniques* 7:
25 980-990, ou qualquer outro promotor (por exemplo, promotores celulares como, por exemplo, promotores celulares eucarióticos que incluem, sem limitação, os promotores de histona, pol III, e de β -actina). Outros promotores virais que podem ser empregados incluem, sem
30 limitação, promotores adenovirais, promotores de timidina

quinase (TK) e promotores de parvovírus B19. A seleção de um promotor adequado será evidente para aqueles habilitados na técnica a partir dos ensinamentos aqui apresentados, e pode ser feita entre promotores regulados ou promotores
5 como descritos acima.

O vetor de plasmídeo retroviral é empregado para a transdução de linhagens de células de empacotamento para formar linhagens de células produtoras. Exemplos de células de empacotamento que podem ser transfectadas incluem, sem
10 limitação, as linhagens celulares PE501, PA317, ϕ -2, ϕ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ϕ CRE, ϕ CRIP, GP+E-86, GP+envAml2 e DAN, como descrito em Miller, "Human Gene Therapy", 1: 5-14 (1990). O vetor pode efetuar a transdução das células de empacotamento por meio de meios conhecidos
15 na técnica. Esses meios incluem, sem limitação, eletroporação, o uso de lipossomos, e precipitação de CaPO_4 . Em uma alternativa, o vetor de plasmídeo retroviral pode ser encapsulado em um lipossomo, ou acoplado a um lipídeo, e depois administrado a um hospedeiro.

20 A linhagem de células produtoras gera partículas infecciosas do vetor retroviral que incluem a(s) seqüência(s) de ácidos nucleicos que codifica as proteínas de ligação multivalentes com função efetora. Essas partículas do vetor retroviral podem então ser empregadas
25 para a transdução de células eucarióticas, *in vitro* ou *in vivo*. As células eucarióticas transduzidas expressarão a(s) seqüência(s) de ácidos nucleicos que codifica a proteína ou o polipeptídeo. As células eucarióticas que podem ser transduzidas incluem, sem limitação, células-tronco
30 embrionárias, além das células-tronco hematopoiéticas,

hepatócitos, fibroblastos, células mononucleares e polimorfonucleares circulantes do sangue periférico, incluindo células mielomonocíticas, linfócitos, mioblastos, macrófagos teciduais, células dendríticas, células de Kupffer, células linfóides e reticuloendoteliais dos linfonodos e baço, ceratinócitos, células endoteliais e células epiteliais brônquicas.

Células hospedeiras

Um aspecto adicional da invenção fornece uma célula hospedeira transformada ou transfectada, ou que de algum outro modo contém qualquer um dos polinucleotídeos ou das construções de clonagem/expressão da invenção. Os polinucleotídeos e as construções de clonagem/expressão são introduzidos em células adequadas com a utilização de qualquer método conhecido na técnica, incluindo transformação, transfecção e transdução. Células hospedeiras incluem as células de um indivíduo submetido à terapia celular ex vivo que incluem, por exemplo, terapia gênica ex vivo. Células hospedeiras eucarióticas contempladas como um aspecto da invenção quando abrigam um polinucleotídeo, vetor ou Proteína, de acordo com a invenção incluem, além das próprias células de um indivíduo (por exemplo, as próprias células de um paciente humano), células VERO, células HeLa, linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO) (incluindo células CHO modificadas capazes de modificar o padrão de glicosilação de moléculas de ligação multivalentes expressas (veja o Pedido de Patente U.S. Publicado N° 2003/0115614 A1, aqui incorporado por referência), células COS (por exemplo, COS-7), W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562, células

HEK293, células HepG2, células N, células 3T3, células de *Spodoptera frugiperda* (por exemplo, células Sf9), células de *Saccharomyces cerevisiae*, e qualquer outra célula eucariótica conhecida na técnica como sendo útil na
5 expressão, e, opcionalmente, isolamento, de uma proteína ou de um peptídeo de acordo com a invenção. Também são contempladas células procarióticas, que incluem, sem limitação, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, um estreptomiceto ou qualquer célula
10 procariótica conhecida na técnica como sendo adequada à expressão e, opcionalmente, isolamento, de uma proteína ou de um peptídeo de acordo com a invenção. No isolamento da proteína ou do peptídeo de células procarióticas, em particular, é contemplado que podem ser usadas metodologias
15 conhecidas na técnica para a extração de proteínas de corpos de inclusão. A seleção de um hospedeiro apropriado está dentro do escopo daqueles habilitados na técnica com base nos ensinamentos aqui apresentados.

As células hospedeiras projetadas podem ser cultivadas
20 em um meio nutriente convencional modificado da forma adequada para a ativação de promotores, seleção de transformantes ou amplificação de genes específicos. As condições de cultura para células hospedeiras específicas selecionadas para expressão, por exemplo, temperatura, pH,
25 e semelhantes, ficarão prontamente evidentes para aqueles habilitados na técnica. Vários sistemas de cultura de células mamíferas também podem ser empregados para a expressão de proteínas recombinantes. Exemplos de sistemas de expressão em mamíferos incluem as linhagens COS-7 de
30 fibroblastos de rim de macaco, descritas por Gluzman, 1981

Cell 23:175, e outras linhagens celulares capazes de expressar um vetor compatível, por exemplo, as linhagens de células C127, 3T3, CHO, HeLa e BHK. Vetores de expressão mamíferos compreenderão uma origem de replicação, um
5 promotor adequado e, opcionalmente, um intensificador, e também quaisquer sítios de ligação de ribossomo necessários, um sítio de poliadenilação, sítios *splice* doadores e receptores, seqüências de terminação da transcrição, e seqüências não transcritas flangeadoras 5',
10 por exemplo, como aqui descrito, em relação à preparação de construções de expressão de proteína de ligação multivalente. As seqüências de DNA derivadas do *splice* de SV40 e os sítios de poliadenilação podem ser usados para fornecer os elementos genéticos não transcritos
15 necessários. A introdução da construção na célula hospedeira pode ser efetuada por diversos métodos com os quais aqueles habilitados na técnica estão familiarizados, incluindo, sem limitação, transfecção com fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-Dextrana ou
20 eletroporação (Davis e cols., 1986 "Basic Methods in Molecular Biology").

Em uma modalidade, uma célula hospedeira é transduzida por uma construção viral recombinante que dirige a expressão de uma proteína ou de um polipeptídeo de acordo
25 com a invenção. A célula hospedeira transduzida produz partículas virais que contêm proteínas ou polipeptídeos expressos derivados de porções da membrana celular de um hospedeiro incorporadas pelas partículas virais durante o brotamento viral.

Composições farmacêuticas

Em algumas modalidades, as composições da invenção, por exemplo, uma proteína de ligação multivalente ou uma composição que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína desse tipo, como aqui descrita, são adequadas para serem administradas sob condições e por um período suficiente para permitir a expressão da proteína codificada em uma célula hospedeira *in vivo* ou *in vitro*, para terapia gênica, e semelhantes. Essas composições podem ser formuladas em composições farmacêuticas para administração de acordo com metodologias bem conhecidas. Composições farmacêuticas geralmente compreendem uma ou mais construções de expressão recombinante e/ou produtos de expressão dessas construções, em combinação com um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável. Esses veículos serão atóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregadas. Para formulações baseadas em ácidos nucleicos ou para formulações que compreendem produtos de expressão de acordo com a invenção, cerca de 0,01 µg/kg a cerca de 100 mg/kg do peso corporal serão administrados, por exemplo, pela via intradérmica, subcutânea, intramuscular ou intravenosa, ou por qualquer via conhecida na técnica como sendo adequada, sob certo conjunto de circunstâncias. Uma dosagem preferida, por exemplo, é de cerca de 1 µg/kg a cerca de 1 mg/kg, com cerca de 5 µg/kg a cerca de 200 µg/kg sendo particularmente preferidos.

Ficará evidente para aqueles habilitados na técnica que o número e a frequência de administrações dependerão da resposta do hospedeiro. Veículos farmacêuticamente

aceitáveis para uso terapêutico são bem conhecidos na técnica farmacêutica, e são descritos, por exemplo, em "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Por exemplo, solução salina
5 estéril e solução salina tamponada com fosfato em pH fisiológico podem ser usadas. Podem ser fornecidos conservantes, estabilizantes, corantes, e semelhantes na composição farmacêutica. Por exemplo, benzoato de sódio, ácido ascórbico e ésteres de ácido p-hidroxibenzóico podem
10 ser adicionados como conservantes. *Id.* a 1449. Além disso, antioxidantes e agentes de suspensão podem ser usados. *Id.* Os compostos da presente invenção podem ser usados tanto na forma de base livre quanto na forma de sal, com ambas as formas sendo consideradas dentro do escopo da presente
15 invenção.

As composições farmacêuticas que contêm uma ou mais construções de ácido nucléico da invenção, ou as proteínas que correspondem aos produtos codificados por essas construções de ácido nucléico, podem estar em qualquer
20 forma que permita que a composição seja administrada a um paciente. Por exemplo, a composição pode estar na forma de um sólido, líquido ou gás (aerossol). Vias de administração típicas incluem, sem limitação, oral, as vias tópica, parenteral (por exemplo, sublingual ou bucal), sublingual,
25 retal, vaginal e intranasal. O termo "parenteral", como aqui usado, inclui injeções subcutâneas, intravenosas, intramusculares, intra-esternais, intracavernosas, intratecais, intrameatais, injeção intra-uretral ou técnicas de infusão. A composição farmacêutica é formulada
30 de forma a permitir que os ingredientes ativos nela

contidos estejam biodisponíveis mediante administração da composição a um paciente. As composições que serão administradas a um paciente assumem a forma de uma ou mais unidades de dosagem, nas quais, por exemplo, um comprimido
5 pode ser uma unidade de dosagem única, e um recipiente de um ou mais compostos da invenção na forma de aerossol que pode conter diversas unidades de dosagem.

Para administração oral, um excipiente e/ou aglutinante pode estar presente. Exemplos são sacarose,
10 caulim, glicerina, amido, dextrinas, alginato de sódio, carboximetilcelulose e etil celulose. Agentes corantes e/ou flavorizantes podem estar presentes. Pode ser empregado um revestimento.

A composição pode estar na forma de um líquido, por exemplo, um elixir, xarope, solução, emulsão ou suspensão.
15 O líquido pode ser para administração oral ou para liberação por injeção, apenas como exemplos. Quando destinadas à administração oral, composições preferidas contêm, além de uma ou mais construções de fusão de domínio
20 de ligação-imunoglobulina ou produto expresso, um ou mais entre um agente adoçante, conservantes, corantes e intensificadores do sabor. Em uma composição destinada à administração por injeção, pode ser incluído um ou mais entre um tensoativo, conservante, agente umidificante,
25 agente dispersante, agente de suspensão, tampão, estabilizante e agente isotônico.

Uma composição farmacêutica líquida, como aqui usada, esteja ela na forma de uma solução, suspensão ou outra semelhante, pode incluir um ou mais dos seguintes
30 adjuvantes: diluentes estéreis, por exemplo, água para

injeção, solução salina, preferivelmente soro fisiológico, solução de Ringer, cloreto de sódio isotônico, óleos fixos, por exemplo, mono- ou diglicerídeos sintéticos que podem servir como meio solvente ou de suspensão, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes; 5 agentes antibacterianos como, por exemplo, álcool benzílico ou metil parabeno; antioxidantes como, por exemplo, ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes como, por exemplo, ácido etilenodiaminatetraacético; tampões 10 como, por exemplo, acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade como, por exemplo, cloreto de sódio ou dextrose. A preparação parenteral pode ser embalada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de múltiplas doses feitos de vidro ou plástico. O soro 15 fisiológico é um adjuvante preferido. Uma composição farmacêutica injetável é preferivelmente estéril.

Pode ser desejável incluir outros componentes na preparação, por exemplo, veículos de liberação que incluem, sem limitação, sais de alumínio, emulsões água-em-óleo, 20 veículos oleosos biodegradáveis, emulsões óleo-em-água, microcápsulas biodegradáveis e lipossomos. Exemplos de substâncias imunoestimuladoras (adjuvantes) para uso nesses veículos incluem N-acetilmuramil-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), lipopolissacarídeos (LPS), glucano, IL-12, GM-CSF, 25 interferon gama e IL-15.

Embora qualquer veículo adequado conhecido por aqueles habilitados na técnica possa ser empregado nas composições farmacêuticas desta invenção, o tipo de veículo irá variar, dependendo do modo de administração e de se uma liberação 30 sustentada é desejada. Para administração parenteral, por

exemplo, injeção subcutânea, o veículo preferivelmente compreende água, solução salina, álcool, uma gordura, uma cera ou um tampão. Para administração oral, qualquer um dos veículos acima ou um veículo sólido, por exemplo, manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glicose, sacarose e carbonato de magnésio, pode ser empregado. Microesferas biodegradáveis (por exemplo, galactida polilática) também podem ser empregadas como veículos para as composições farmacêuticas desta invenção. Microesferas biodegradáveis adequadas são reveladas, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs 4.897.268 e 5.075.109. A esse respeito, prefere-se que a microesfera seja maior do que aproximadamente 25 microns.

As composições farmacêuticas também podem conter diluentes, por exemplo, tampões, antioxidantes, por exemplo, ácido ascórbico, polipeptídeos de baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos), proteínas, aminoácidos, carboidratos (por exemplo, glicose, sacarose ou dextrinas), agentes quelantes (por exemplo, EDTA), glutatona e outros estabilizantes e excipientes. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina sérica inespecífica são diluentes exemplares adequados. De preferência, o produto é formulado como um liofilizado com a utilização de soluções excipientes apropriadas (por exemplo, sacarose) como diluentes.

As composições farmacêuticas de acordo com a invenção também incluem proteínas estabilizadas e formulações farmacêuticas líquidas estáveis de acordo com tecnologia conhecida na técnica, incluindo a tecnologia revelada no Pedido de Patente U.S. Publicado Nº 2006/0008415 A1, aqui

incorporado por referência. Essas tecnologias incluem a derivatização de uma proteína, em que a proteína compreende um grupo tiol acoplado a N-acetil-L-cisteína, N-etil-maleimida ou cisteína.

5 Como descrito acima, a presente invenção inclui composições capazes de liberar moléculas de ácidos nucleicos que codificam proteínas de ligação multivalentes com função efetora. Essas composições incluem vetores virais recombinantes, por exemplo, retrovírus (veja WO
10 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 e WO 94/03622), adenovírus (veja Berkner, 1988 *Biotechniques* 6: 616-627; Li e cols., 1993 *Hum. Gene Ther.* 4: 403-409; Vincent e cols., *Nat. Genet.* 5: 130-134; e Kolls e cols., 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 215-219), vírus da
15 varíola (veja Patente U.S. N° 4.769.330; Patente U.S. N° 5.017.487 e WO 89/01973), moléculas de ácido nucleico da construção de expressão recombinante em complexo com uma molécula policatiónica (veja WO 93/03709), e ácidos nucleicos associados a lipossomos (veja Wang e cols., 1987
20 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 7.851). Em certas modalidades, o DNA pode estar ligado a adenovírus mortos ou inativados (veja Curiel e cols., 1992 *Hum. Gene Ther.* 3: 147-154; Cotton e cols., 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 6.094). Outras composições adequadas incluem
25 combinações DNA-ligante (veja Wu e cols., 1989 *J. Biol. Chem.* 264: 16.985-16.987) e lipídeo-DNA (veja Felgner e cols., 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 7.413-7.417).

Além de procedimentos diretos *in vivo*, podem ser usados procedimentos *ex vivo*, nos quais as células são
30 removidas de um hospedeiro (por exemplo, um indivíduo como,

por exemplo, um paciente humano), modificadas e colocadas no mesmo animal hospedeiro ou em outro animal hospedeiro. Ficará evidente que é possível utilizar qualquer uma das composições observadas acima para a introdução de

5 construções da invenção, tanto as proteínas/polipeptídeos quanto os ácidos nucléicos que as codificam em células do tecido em um contexto *ex vivo*. Protocolos para métodos virais, físicos e químicos de captação são bem conhecidos na técnica.

10 **Geração de anticorpos**

Anticorpos policlonais dirigidos contra um polipeptídeo de antígeno geralmente são produzidos em animais (por exemplo, coelhos, hamsters, cabras, carneiros, cavalos, porcos, ratos, gerbos, porquinhos-da-índia,

15 camundongos, ou qualquer outro mamífero adequado, além de outras espécies não mamíferas) por meio de múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoneais do polipeptídeo do antígeno ou de um fragmento deste e um adjuvante. Adjuvantes incluem, sem limitação, adjuvante de Freund

20 completo ou incompleto, géis minerais como, por exemplo, hidróxido de alumínio, e substâncias tensoativas como, por exemplo, lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões oleosas e dinitrofenol. BCG (bacilos de Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum* também são

25 adjuvantes potencialmente úteis. Pode ser útil conjugar um polipeptídeo do antígeno a uma proteína transportadora que seja imunogênica na espécie a ser imunizada; veículos típicos incluem hemocianina *keyhole limpet*, albumina sérica, tireoglobulina bovina ou inibidor de tripsina de

30 soja. Além disso, agentes de agregação como, por exemplo,

alume, são usados para intensificar a resposta imune. Após imunização, os animais são sangrados e o soro é testado quanto à titulação do anticorpo anti-poli-peptídeo do antígeno com o uso de técnicas convencionais. Anticorpos policlonais podem ser utilizados nos soros dos quais foram detectados, ou podem ser purificados dos soros, usando, por exemplo, cromatografia por afinidade do antígeno.

Anticorpos monoclonais dirigidos contra polipeptídeos do antígeno são produzidos com a utilização de qualquer método que permita a produção de moléculas de anticorpo por linhagens celulares contínuas em cultura. Por exemplo, podem ser feitos anticorpos monoclonais pelo método do hibridoma, como descrito em Kohler e cols., *Nature* 256: 495 [1975]; a técnica do hibridoma de célula B humana (Kosbor e cols., *Immunol Today* 4: 72, 1983; Cote e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2.026-2.030, 1983) e a técnica do hibridoma do EBV (Cole e cols., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss Inc, Nova York N.Y., pp 77-96, (1985).

Quando é empregada a técnica do hibridoma, podem ser usadas linhagens de células de mieloma. As linhagens celulares adequadas para uso em procedimentos de fusão que produzem hibridoma preferivelmente não produzem anticorpo endógeno, possuem alta eficiência de fusão, e exibem deficiências enzimáticas que a tornam incapazes de crescer em certos meios seletivos que apóiam o crescimento apenas das células fundidas desejadas (hibridomas). Por exemplo, quando o animal imunizado for um camundongo, poderá ser usado P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 e S194/5XX0 Bul; para

ratos, pode-se usar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F e 4B210; e U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 e UC729-6 são úteis em relação às fusões de células.

Em uma modalidade alternativa, podem ser produzidos anticorpos humanos a partir de bibliotecas de exibição de fago (Hoogenboom e cols., *J. Mol. Biol.* 227: 381 [1991]; Marks e cols., *J. Mol. Biol.* 222: 581; veja também a Patente U.S. N° 5.885.793). Esses processos simulam a seleção imune por meio da exibição de repertórios de anticorpos na superfície de bacteriófago filamentosos, e a seleção subsequente de fago por sua ligação a um antígeno de escolha. Uma dessas técnicas é descrita no Pedido PCT N° PCT/US98/17364, depositado no nome de Adams e cols., que descreve o isolamento de anticorpos agonistas de alta afinidade e funcionais para receptores MPL e *msk* com a utilização dessa abordagem. Nessa abordagem, pode ser criado um repertório completo de genes de anticorpos humanos por clonagem de genes V humanos naturalmente reorganizados de linfócitos do sangue periférico, como descrito previamente (Mullinax, e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 8.095-8.099 [1990]).

Alternativamente, pode ser criado um repertório sintético inteiro da cadeia pesada humana a partir dos segmentos não organizados do gene V por montagem de cada segmento V_H humano com segmentos D de nucleotídeos aleatórios, juntamente com um segmento J humano (Hoogenboom, e cols., *J. Mol. Biol.* 227: 381-388 [1992]). Da mesma forma, pode ser construído um repertório de cadeia leve por combinação de cada segmento V humano com um segmento J (Griffiths, e cols., *EMBO J.* 13: 3.245-3.260

[1994]). Nucleotídeos que codificam o anticorpo completo (ou seja, tanto as cadeias pesadas quanto as cadeias leves) são ligados como um fragmento Fv de cadeia simples, e esse polinucleotídeo é ligado a um nucleotídeo que codifica uma
5 pequena proteína de revestimento de fago filamentoso. Quando essa proteína de fusão é expressa na superfície do fago, um polinucleotídeo que codifica um anticorpo específico poderá ser identificado por seleção com o uso de um antígeno imobilizado.

10 Além dos métodos clássicos de geração de anticorpos policlonais e monoclonais, qualquer método para a geração de qualquer forma conhecida de anticorpo é contemplado. Além de anticorpos policlonais e monoclonais, formas de anticorpos incluem anticorpos quimerizados, anticorpos
15 humanizados, anticorpos com enxerto de CDR e fragmentos e variantes de anticorpos.

Variantes e derivados de agentes de ligação específicos

Em um exemplo, são aqui fornecidas variantes de
20 inserção nas quais um ou mais resíduos de aminoácidos suplementam uma sequência de aminoácidos do agente de ligação específico. As inserções podem estar localizadas em um dos terminais ou em ambos os terminais da proteína, ou podem estar posicionadas dentro de regiões internas da
25 sequência de aminoácidos do agente de ligação específico. Produtos variantes da invenção também incluem produtos maduros do agente de ligação específico, ou seja, produtos do agente de ligação específico nos quais sequências líderes ou sinalizadoras são removidas, e a proteína
30 resultante possui resíduos adicionais no terminal amino. Os

resíduos adicionais do terminal amino podem ser derivados de outra proteína, ou podem incluir um ou mais resíduos que não são identificáveis como sendo derivados de uma proteína específica. Polipeptídeos com um resíduo adicional de metionina na posição -1 (por exemplo, Met-1-peptídeos de ligação multivalentes com função efetora) são contemplados, bem como polipeptídeos da invenção com resíduos adicionais de metionina e lisina nas posições -2 e -1 (Met-2-Lys-1-proteínas de ligação multivalentes com função efetora).

Variantes dos polipeptídeos da invenção que possuem resíduos adicionais Met, Met-Lys ou Lys (ou um ou mais resíduos básicos em geral) são particularmente úteis para o aumento da produção de proteína recombinante em células hospedeiras bacterianas.

A invenção também engloba polipeptídeos específicos da invenção que possuem resíduos de aminoácidos adicionais que surgem em decorrência de sistemas de expressão específicos. Por exemplo, o uso de vetores disponíveis comercialmente que expressam um polipeptídeo desejado como parte de um produto de fusão glutathione-S-transferase (GST) fornece o polipeptídeo desejado que possui um resíduo adicional de glicina na posição -1 após clivagem do componente GST do polipeptídeo desejado. Variantes que resultam da expressão em outros sistemas de vetor também são contempladas, incluindo aquelas nas quais *tags* de histidina são incorporados na sequência de aminoácidos, geralmente no terminal carboxi e/ou amino da sequência.

Em outro aspecto, a invenção fornece variantes de eliminação nas quais um ou mais resíduos de aminoácidos em um polipeptídeo da invenção são removidos. Eliminações

podem ser efetuadas em um terminal ou em ambos os terminais do polipeptídeo, ou pela remoção de um ou mais resíduos dentro da sequência de aminoácidos. Variantes de eliminação incluem necessariamente todos os fragmentos de um polipeptídeo de acordo com a invenção.

Fragmentos de anticorpo referem-se aos polipeptídeos que possuem uma sequência que corresponde a pelo menos parte da região variável de uma sequência de imunoglobulina. Os fragmentos podem ser gerados, por exemplo, por clivagem enzimática ou química de polipeptídeos que correspondem aos anticorpos de comprimento total. Outros fragmentos de ligação incluem aqueles gerados por técnicas sintéticas ou por técnicas de DNA recombinante como, por exemplo, a expressão de plasmídeos recombinantes que contêm sequências de ácidos nucleicos que codificam regiões variáveis parciais de anticorpo. Fragmentos polipeptídicos preferidos exibem propriedades imunológicas únicas, ou específicas, para um alvo como aqui descrito. Os fragmentos da invenção que possuem as propriedades imunológicas desejadas podem ser preparados por qualquer um dos métodos bem conhecidos e rotineiramente praticados na técnica.

Ainda em outro aspecto, a invenção fornece variantes de substituição de polipeptídeos de ligação multivalentes que possuem função efetora. As variantes de substituição incluem aqueles polipeptídeos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos em uma sequência de aminoácidos são removidos e substituídos com resíduos alternativos. Em algumas modalidades, as substituições possuem natureza conservadora; no entanto, a invenção engloba substituições

que também são não conservadoras. Os aminoácidos podem ser classificados de acordo com suas propriedades físicas e pela contribuição para a estrutura secundária e terciária da proteína. Uma substituição conservadora é reconhecida na

5 técnica como uma substituição de um aminoácido por outro aminoácido que possua propriedades similares. Substituições conservadoras exemplares são apresentadas na Tabela A (veja WO 97/09433, página 10, publicada em 13 de março de 1997 e PCT/GB96/02197, depositada em 9/6/96), imediatamente

10 abaixo.

Tabela A

Substituições conservadoras I		
CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICA	AMINOÁCIDO
Alifática	Não polar	G A P I L V
	Polar – não carregado	S T M N Q
	Polar - carregado	D E K R
Aromática		H F W Y
Outra		N Q D E

Alternativamente, os aminoácidos conservadores podem ser agrupados como descrito em Lehninger, [Biochemistry, Segunda Edição; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), p.71-

15 77], como apresentado na Tabela B, imediatamente abaixo.

Tabela B

Substituições conservadoras II		
CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICA	AMINOÁCIDO
Não polar (hidrofóbica)	A. Alifática:	A L I V P
	B. Aromática	F W
	C. Contendo	M

	enxofre	
	D. Limite	G
Não carregada-polar	A. Hidroxil	S T Y
	B. Amidas	N Q
	C. Sulfidrila	C
	D. Limite	G
Carregada positivamente (básica)		K R H
Carregada negativamente (ácida)		D E

Substituições conservadoras II		
CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICA	AMINOÁCIDO
Não polar (hidrofóbica)	A. Alifática:	A L I V P
	B. Aromática:	F W
	C. Contendo enxofre	M
	D. Limite	G
Não carregada-polar	A. Hidroxil	S T Y
	B. Amidas	N Q
	C. Sulfidrila	C
	D. Limite	G
Carregada		K R H

positivamente (básica)		
Carregada negativamente (ácida)		D E

A invenção também fornece derivados de polipeptídeos do agente de ligação específico. Derivados incluem polipeptídeos do agente de ligação específico que abrigam modificações diferentes de inserções, eliminações ou substituições de resíduos de aminoácidos. De preferência, as modificações possuem natureza covalente, e incluem, por exemplo, ligação química com polímeros, lipídeos, outras porções orgânicas e inorgânicas. Derivados da invenção podem ser preparados para aumentar a meia-vida circulante de um polipeptídeo do agente de ligação específico, ou podem ser projetados para aumentar a capacidade de direcionamento para o polipeptídeo às células, tecidos ou órgãos desejados.

A invenção ainda engloba proteínas de ligação multivalentes com função efetora que são modificadas ou derivatizadas covalentemente para incluir uma ou mais adesões de polímeros hidrossolúveis como, por exemplo, polietileno glicol, polioxietileno glicol ou polipropileno glicol, como descrito nas Patentes U.S. N^{os}: 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 e 4.179.337. Ainda outros polímeros úteis conhecidos na técnica incluem monometoxi-polietileno glicol, dextrana, celulose e outros polímeros baseados em carboidratos, poli-(N-vinil pirrolidona)-polietileno glicol, homopolímeros de propileno glicol, um copolímero de polipropileno óxido/etileno óxido,

polióis polioxietilados (por exemplo, glicerol) e álcool polivinílico, além de misturas desses polímeros. São particularmente preferidas proteínas derivatizadas com polietileno glicol (PEG). Polímeros hidrossolúveis podem
5 ser unidos em posições específicas, por exemplo, no terminal amino das proteínas e polipeptídeos de acordo com a invenção, ou anexados aleatoriamente a uma ou mais cadeias laterais do polipeptídeo. O uso de PEG para o aumento das capacidades terapêuticas é descrito na Patente
10 U.S. N° 6.133.426 para Gonzales, *e cols.*

Sítios-alvo para mutagênese de imunoglobulina

Estão disponíveis algumas estratégias para manipular propriedades inerentes de uma imunoglobulina antígeno-específica (por exemplo, um anticorpo) que não estão
15 disponíveis para moléculas de ligação que não se baseiam em imunoglobulina. Um bom exemplo das estratégias que favorecem, por exemplo, moléculas baseadas em anticorpo, em relação a essas alternativas é a modulação *in vivo* da afinidade de um anticorpo por seu alvo por meio da
20 maturação da afinidade, que se beneficia da hipermutação somática de genes de imunoglobulina para gerar anticorpos de afinidade crescente à medida que a resposta imune progride. Adicionalmente, foram desenvolvidas tecnologias recombinantes para alterar a estrutura de imunoglobulinas e
25 regiões e domínios da imunoglobulina. Dessa forma, podem ser produzidos polipeptídeos derivados de anticorpos que exibem afinidade alterada por certo antígeno, e diversos protocolos de purificação e testes de monitoramento são conhecidos na técnica para a identificação e purificação ou
30 isolamento desses polipeptídeos. Com a utilização dessas

técnicas, podem ser obtidos polipeptídeos que compreendem domínios de ligação derivados de anticorpos que exibem afinidade diminuída ou aumentada por um antígeno. As estratégias para a geração das variantes do polipeptídeo
5 que exibem afinidade alterada incluem o uso de mutagênese sítio-específica ou aleatória do DNA que codifica o anticorpo para alterar os aminoácidos presentes na proteína, seguida por uma etapa de rastreamento projetada para recuperar variantes de anticorpo que exibem a
10 alteração desejada, por exemplo, afinidade aumentada ou diminuída em relação ao anticorpo parente não modificado ou de referência.

Os resíduos de aminoácidos mais comumente visados nas estratégias mutagênicas para alterar a afinidade são
15 aqueles na região determinante de complementaridade (CDR) ou região hipervariável das regiões variáveis da cadeia leve e pesada de um anticorpo. Essas regiões contêm os resíduos que interagem físico-quimicamente com um antígeno, além de outros aminoácidos que afetam o arranjo espacial
20 desses resíduos. No entanto, foi demonstrado que os aminoácidos nas regiões estruturais dos domínios variáveis fora das regiões CDR também fazem contribuições substanciais para as propriedades de ligação de antígeno de um anticorpo, e podem ser visados para manipular essas
25 propriedades. Veja Hudson, P.J. *Curr. Opin. Biotech.*, 9: 395-402 (1999) e referências nele citadas.

Podem ser produzidas bibliotecas de variantes de anticorpo menores e mais eficazmente rastreadas restringindo-se a mutagênese aleatória ou sítio-dirigida a
30 sítios nas CDRs que correspondem às áreas com tendência à

"hipermutação" durante a maturação somática do processo de afinidade. Veja Chowdhury, e cols., *Nature Biotech.*, 17: 568-572 (1999) e referências nele citadas. Os tipos de elementos de DNA conhecidos por definirem sítios de
5 hipermutação dessa forma incluem repetições diretas e invertidas, certas seqüências de consenso, estruturas secundárias e palíndromos. As seqüências de DNA de consenso incluem a seqüência de quatro bases Purina-G-Pirimidina-A/T (ou seja, A ou G - G - C ou T - A ou T) e o códon de serina
10 AGY (em que Y pode ser C ou T).

Dessa forma, outro aspecto da invenção é um conjunto de estratégias mutagênicas para a modificação da afinidade de um anticorpo por seu alvo. Essas estratégias incluem mutagênese da região variável inteira de uma cadeia pesada
15 e/ou leve, mutagênese apenas das regiões CDR, mutagênese dos sítios de hipermutação de consenso dentro das CDRs, mutagênese de regiões estruturais, ou qualquer combinação dessas abordagens ("mutagênese" nesse contexto poderia ser aleatória ou sítio-dirigida). A delineação definitiva das
20 regiões CDR e a identificação de resíduos que compreendem o sítio de ligação de um anticorpo podem ser obtidas pela solução da estrutura do anticorpo em questão, e do complexo anticorpo:ligante, por meio de metodologias conhecidas por aqueles habilitados na técnica, por exemplo, cristalografia
25 por raios X. Vários métodos baseados na análise e caracterização dessas estruturas cristais do anticorpo são conhecidos por aqueles habilitados na técnica, e podem ser empregados para aproximar as regiões CDR. Exemplos desses métodos usados comumente incluem as definições de Kabat,
30 Chothia, AbM e de contato.

A definição de Kabat se baseia na variabilidade de seqüência e é a definição mais comumente usada para prever regiões CDR (Johnson, e cols., *Nucleic Acids Research*, 28: 214-8 (2000)). A definição de Chothia se baseia na
5 localização das regiões estruturais em alça (Chothia e cols., *J. Mol. Biol.*, 196: 901-17 [1986]; Chothia e cols., *Nature*, 342: 877-83 [1989]). A definição AbM é uma combinação das definições de Kabat e Chothia. AbM é um conjunto integral de programas para modelagem da estrutura
10 de anticorpos produzido por "Oxford Molecular Group" (Martin, e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci .U.S.A.* 86: 9.268-9.272 [1989]; Rees, e cols. "ABMTM, a computer program for modeling variable regions of antibodies", Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd.). A suíte AbM modela a estrutura
15 terciária de um anticorpo a partir da seqüência primária com a utilização de uma combinação de bases de dados de conhecimento e métodos *ab initio*. Uma definição adicional, conhecida como a definição de contato, foi recentemente introduzida. Veja MacCallum e cols., *J. Mol. Biol.*, 5: 732-
20 45 (1996). Essa definição se baseia em uma análise das estruturas cristais complexas disponíveis.

Por convenção, os domínios de CDR na cadeia pesada são tipicamente denominados H1, H2 e H3, e são numerados seqüencialmente em uma ordem do terminal amino ao terminal
25 carbóxi. As regiões CDR na cadeia leve são tipicamente denominadas L1, L2 e L3, e são numeradas seqüencialmente na ordem do terminal amino ao terminal carbóxi.

A CDR-H1 tem comprimento de aproximadamente 10 a 12 resíduos e tipicamente começa 4 resíduos após um Cys de
30 acordo com as definições de Chothia e AbM, ou tipicamente 5

resíduos mais tarde, de acordo com a definição de Kabat. O H1 é tipicamente seguido por um Trp, tipicamente Trp-Val, mas também Trp-Ile ou Trp-Ala. O comprimento de H1 é de aproximadamente 10 a 12 resíduos de acordo com a definição
5 AbM, enquanto a definição de Chothia exclui os últimos 4 resíduos.

A CDR-H2 tipicamente começa 15 resíduos após o final de H1 de acordo com as definições de Kabat e AbM. Os resíduos que precedem H2 são tipicamente Leu-Glu-Trp-Ile-
10 Gly, mas há diversas variações. H2 é tipicamente seguido pela sequência de aminoácidos Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala. De acordo com a definição de Kabat, o comprimento de H2 é de aproximadamente 16 a 19 resíduos, enquanto a definição AbM
15 prevê o comprimento como sendo tipicamente de 9 a 12 resíduos.

A CDR-H3 tipicamente começa 33 resíduos após o final de H2 e é tipicamente precedida pela sequência de aminoácidos Cys-Ala-Arg. H3 é tipicamente seguido pelo
20 aminoácido Gly. O comprimento de H3 varia de 3 a 25 resíduos.

A CDR-L1 tipicamente começa aproximadamente no resíduo 24, e irá tipicamente seguir um Cys. O resíduo após a CDR-L1 é sempre Trp, e tipicamente começará com uma das
25 seguintes seqüências: Trp-Tyr-Gln, Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln ou Trp-Tyr-Leu. O comprimento de CDR-L1 é de aproximadamente 10 a 17 resíduos.

A CDR-L2 começa aproximadamente 16 resíduos após o final de L1. Ela geralmente segue os resíduos Ile-Tyr, Val-
30 Tyr, Ile-Lys ou Ile-Phe. O comprimento de CDR-L2 é de

aproximadamente 7 resíduos.

A CDR-L3 tipicamente começa 33 resíduos após o final de L2, e tipicamente segue um Cys. L3 é tipicamente seguida pela sequência de aminoácidos Phe-Gly-XXX-Gly. O
5 comprimento de L3 é de aproximadamente 7 a 11 resíduos.

Foram descritos na técnica vários métodos para a modificação de anticorpos, incluindo, por exemplo, métodos de produção de anticorpos humanizados nos quais a sequência da estrutura central da região variável da cadeia pesada da
10 imunoglobulina humanizada é 65% a 95% idêntica à sequência da estrutura central da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina doadora. Cada cadeia da imunoglobulina humanizada normalmente compreenderá, além das CDRs, aminoácidos da estrutura central da imunoglobulina doadora
15 que sejam, por exemplo, capazes de interagir com as CDRs para efetuar a afinidade de ligação, por exemplo, um ou mais aminoácidos que estão imediatamente adjacentes a uma CDR na imunoglobulina doadora, ou aqueles em até cerca de 3 angstroms, como previsto por modelagem molecular. Cada uma
20 das cadeias pesadas e leves pode ser projetada com a utilização de um ou de todos os vários critérios de posição. Quando combinadas em um anticorpo intacto, imunoglobulinas humanizadas são substancialmente não imunogênicas em seres humanos e retêm substancialmente a
25 mesma afinidade que a imunoglobulina doadora para o antígeno, por exemplo, uma proteína ou outro composto que contenha um epitopo.

Em um exemplo, são descritos métodos para a produção de anticorpos, e fragmentos de anticorpo, que possuem
30 especificidade de ligação similar a um anticorpo parente,

mas que possuem características humanas aumentadas. Anticorpos humanizados são obtidos por embaralhamento de cadeias usando, por exemplo, tecnologia de exibição de fago e um polipeptídeo que compreende a região variável da
5 cadeia pesada ou leve de um anticorpo não humano específico para um antígeno de interesse, que é depois combinada com um repertório de regiões variáveis humanas complementares da cadeia (leve ou pesada). São identificados pareamentos híbridos que são específicos para o antígeno de interesse,
10 cadeias humanas dos pareamentos selecionados são combinadas com um repertório de domínios variáveis humanos complementares (pesados ou leves). Em outra modalidade, um componente de uma CDR de um anticorpo não humano é combinado com um repertório de partes de componentes de
15 CDRs de anticorpos humanos. Da biblioteca de dímeros de polipeptídeo de anticorpo resultante, são selecionados híbridos que podem ser usados em uma segunda etapa de embaralhamento de humanização; alternativamente, essa segunda etapa é eliminada, caso o híbrido já tenha caráter
20 humano suficiente para ter valor terapêutico. Métodos de modificação para aumentar o caráter humano são conhecidos na técnica.

Outro exemplo é um método para a produção de anticorpos humanizados usando uma seqüência de aminoácidos
25 de CDR como substituição para a seqüência de aminoácidos de CDR humana correspondente e/ou usando uma seqüência de aminoácidos de FR como substituição para as seqüências de aminoácidos de FR humana correspondentes.

Ainda outro exemplo fornece métodos para a
30 identificação dos resíduos de aminoácidos de um domínio

variável de anticorpo que podem ser modificados, sem diminuir a afinidade nativa do domínio de ligação de antígeno, ao mesmo tempo em que se reduz sua imunogenicidade com relação a uma espécie heteróloga, e
5 métodos para a preparação dessas regiões variáveis de anticorpo modificadas como úteis para administração a espécies heterólogas.

A modificação de uma imunoglobulina, por exemplo, um anticorpo, por qualquer um dos métodos conhecidos na
10 técnica é projetada para se obter afinidade de ligação aumentada ou diminuída por um antígeno, e/ou para reduzir a imunogenicidade do anticorpo no receptor e/ou para modular os níveis da atividade efetora. Em uma abordagem, anticorpos humanizados podem ser modificados para eliminar
15 sítios de glicosilação a fim de aumentar a afinidade do anticorpo por seu antígeno cognato (Co, e cols., *Mol. Immunol.* 30: 1.361-1.367 [1993]). Técnicas como, por exemplo, "remodelagem", hiperquimerização e "veneering/resurfacing" produziram anticorpos humanizados
20 com maior potencial terapêutico (Vaswami, e cols., *Annals of Allergy, Asthma, & Immunol* 81: 105 (1998); Roguska, e cols., *Prot. Engineer.* 9: 895-904 (1996)). Veja também a Patente U.S. N° 6.072.035, que descreve métodos para a remodelagem de anticorpos. Embora essas técnicas diminuam a
25 imunogenicidade do anticorpo por redução do número de resíduos estranhos, elas não evitam respostas anti-idiotípicas e anti-alotípicas após administrações repetidas dos anticorpos. Alternativas a esses métodos para a redução de imunogenicidade são descritas em Gilliland e cols., *J.*
30 *Immunol.* 62(6): 3.663-71 (1999).

Em muitos casos, a humanização de anticorpos resulta na perda da capacidade de ligação de antígeno. Portanto, é preferível "mutar de forma retrógrada" o anticorpo humanizado para incluir um ou mais dos resíduos de aminoácidos encontrados no anticorpo original (mais freqüentemente de roedor), em uma tentativa de restaurar a afinidade de ligação do anticorpo. Veja, por exemplo, Saldanha e cols., *Mol. Immunol.* 36: 709-19 (1999).

Demonstrou-se que a glicosilação de imunoglobulinas afeta as funções efetoras, a estabilidade estrutural e a taxa de secreção por células produtoras de anticorpo (veja Leatherbarrow e cols., *Mol. Immunol.* 22:407 (1985), aqui incorporado por referência). Os grupos carboidrato responsáveis por essas propriedades estão geralmente anexados às regiões constantes de anticorpos. Por exemplo, a glicosilação de IgG em Asn 297 no domínio C_{H2} facilita a capacidade plena da IgG para ativar a citólise dependente de complemento (Tao e cols., *J. Immunol.* 143: 2.595 (1989)). A glicosilação de IgM em Asn 402 no domínio C_{H3} , por exemplo, facilita a montagem adequada e a atividade citolítica do anticorpo (Muraoka e cols., *J. Immunol.* 142:695 (1989)). A remoção de sítios de glicosilação nas posições 162 e 419 nos domínios C_{H1} e C_{H3} de um anticorpo IgA leva à degradação intracelular e à inibição de pelo menos 90% da secreção (Taylor e cols., Wall, *Mol. Cell. Biol.* 8: 4.197 (1988)). Conseqüentemente, as moléculas da invenção incluem imunoglobulinas alteradas por mutação que exibem padrões de glicosilação alterados por mutação de resíduos específicos em, por exemplo, uma sub-região constante, para alterar a função efetora. Veja Co e cols.,

Mol. Immunol. 30: 1.361-1.367 (1993), Jacquemon e cols., J. Thromb. Haemost. 4: 1.047-1.055 (2006), Schuster e cols., Cancer Res. 65: 7.934-7.941 (2005) e Warnock e cols., Biotechnol Bioeng. 92: 831-842 (2005), cada um deles aqui
5 incorporado por referência.

A invenção também inclui moléculas de ligação multivalentes que possuem pelo menos um domínio de ligação que é pelo menos 80%, preferivelmente 90% ou 95% ou 99% idêntico em sequência a uma sequência conhecida da região
10 variável de imunoglobulina e que possui pelo menos um resíduo que difere dessa região variável de imunoglobulina, em que o resíduo alterado adiciona um sítio de glicosilação, altera a localização de um ou mais sítios de glicosilação ou, de preferência, remove um sítio de
15 glicosilação, em relação à região variável de imunoglobulina. Em algumas modalidades, a alteração remove um sítio de glicosilação ligado ao N em uma estrutura central da região variável de imunoglobulina, ou remove um sítio de glicosilação ligado ao N que ocorre na estrutura
20 central da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina na região que se estende aproximadamente no resíduo de aminoácido 65 até aproximadamente no resíduo de aminoácido 85, com o uso da convenção de numeração de Co e cols., J. Immunol. 148: 1.149, (1992).

25 Qualquer método conhecido na técnica é contemplado para a produção das moléculas de ligação multivalentes que exibem padrões de glicosilação alterados em relação a uma sequência de imunoglobulina de referência. Por exemplo, pode ser empregada qualquer uma entre diversas técnicas
30 genéticas para alterar um ou mais resíduos em particular.

Alternativamente, as células hospedeiras usadas para a produção podem ser projetadas para produzir o padrão de glicosilação alterado. Um método conhecido na técnica, por exemplo, fornece glicosilação alterada na forma de variantes divididas, não fucosiladas, que aumentam a ADCC. As variantes resultam da expressão em uma célula hospedeira que contém uma enzima modificadora de oligossacarídeo. Alternativamente, a tecnologia Potelligent de BioWa/Kyowa Hakko é contemplada para reduzir o teor de fucose de moléculas glicosiladas de acordo com a invenção. Em um método conhecido, é fornecida uma célula CHO hospedeira para a produção recombinante de imunoglobulinas que modifica o padrão de glicosilação da região F_c da imunoglobulina, por meio da produção de GDP-fucose. Essa tecnologia é disponível para modificar o padrão de glicosilação de uma sub-região constante de uma molécula de ligação multivalente de acordo com a invenção.

Além de modificar as propriedades de ligação de domínios de ligação, por exemplo, dos domínios de ligação de imunoglobulinas, e além dessas modificações como humanização, a invenção compreende a modulação da função efetora por alteração ou mutação de resíduos que contribuem para a função efetora, por exemplo, a função efetora de uma sub-região constante. Essas modificações podem ser efetuadas com a utilização de qualquer metodologia conhecida na técnica, por exemplo, a abordagem revelada em Presta e cols., *Biochem. Soc. Trans.* 30: 487-490 (2001), aqui incorporada por referência. Abordagens exemplares incluiriam o uso do protocolo revelado em Presta e cols. para modificar resíduos específicos conhecidos por afetarem

a ligação em uma ou mais sub-regiões constantes que correspondem a FC γ RI, FC γ RII, FC γ RIII, FC α R e FC ϵ R.

Em outra abordagem, a tecnologia "Xencor XmAb" é disponível pra projetar sub-regiões constantes que correspondem aos domínios F_C para aumentar a função efetora de morte celular. Veja Lazar e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(11): 4.005-4.010 (2006), aqui incorporado por referência. Com a utilização dessa abordagem, por exemplo, podem ser geradas sub-regiões constantes otimizadas para especificidade e ligação a FC γ R, aumentando, dessa forma, a função efetora de morte celular.

Produção de proteínas de ligação multivalentes com função efetora

Podem ser utilizados diversos sistemas de vetor de expressão/hospedeiro para conter e expressar a proteína de ligação multivalente (com função efetora) da invenção. Esses sistemas incluem, sem limitação, microorganismos como, por exemplo, bactérias transformadas com bacteriófago recombinante, plasmídeo, cosmídeo ou outros vetores de expressão; leveduras transformadas com vetores de expressão ou *shuttle* de levedura; sistemas de células de inseto infectadas com vetores de expressão de vírus (por exemplo, baculovírus); sistemas de células de plantas transfectadas com vetores de expressão de vírus (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformadas com vetores de expressão bacterianos (por exemplo, plasmídeo Ti ou pBR322); ou sistemas de células animais. Células mamíferas que são úteis nas produções de proteína de ligação multivalente recombinante incluem, sem limitação, células VERO, células HeLa,

linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO), células COS (por exemplo, COS-7), W138, BHK, HepG2, 3T3, RN, MDCK, A549, PC 12, K562 e células HEK293. Protocolos exemplares para a expressão recombinante da proteína de
5 ligação multivalente serão aqui descritos posteriormente.

Um vetor de expressão pode compreender a unidade de transcrição que compreende uma montagem de: (1) um elemento ou elementos genéticos que possuem um papel regulador na expressão gênica, por exemplo, um promotor, intensificador,
10 ou sítio de ligação fator-específico, (2) uma sequência estrutural ou uma sequência que codifica o agente de ligação que é transcrito em mRNA e traduzido em proteína, e (3) sequências de iniciação e de terminação de transcrição apropriadas. As unidades estruturais destinadas a serem
15 usadas em leveduras ou em sistemas de expressão eucarióticos preferivelmente incluem uma sequência líder que permite a secreção extracelular da proteína traduzida por uma célula hospedeira. Alternativamente, quando a proteína de ligação multivalente recombinante for expressa
20 sem uma sequência líder ou de transporte, ela poderá incluir um resíduo metionina no terminal amino. Esse resíduo pode ou não ser subsequente clivado da proteína recombinante expressa para fornecer uma proteína de ligação multivalente final.

25 Por exemplo, as proteínas de ligação multivalentes podem ser expressas de forma recombinante em leveduras com o uso de um sistema de expressão disponível comercialmente, por exemplo, o Sistema de Expressão Pichia (Invitrogen, San Diego, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Esse
30 sistema se baseia na sequência pré-pró-alfa para dirigir a

secreção, mas a transcrição da inserção é conduzida pelo promotor de álcool oxidase (AOX1) mediante indução por metanol. O peptídeo de ligação multivalente secretado pode ser purificado do meio de crescimento de levedura, por exemplo, pelos métodos usados para purificar o peptídeo dos sobrenadantes de células bacterianas e mamíferas.

Alternativamente, o cDNA que codifica o peptídeo de ligação multivalente pode ser clonado no vetor de expressão de baculovírus pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Esse vetor pode ser usado de acordo com as instruções do fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* em meio sem proteína SF9 e para produzir proteína recombinante. A proteína de ligação multivalente pode ser purificada e concentrada do meio com o uso de uma coluna de heparina-Sefarose (Pharmacia, Piscataway, NJ). Sistemas de insetos para a expressão de proteína, por exemplo, o sistema SF9, são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Em um desses sistemas, vírus de poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) pode ser usado como um vetor para expressar genes estranhos nas células de *Spodoptera frugiperda* ou em larvas de *Trichoplusia*. A sequência que codifica o peptídeo de ligação multivalente pode ser clonada em uma região não essencial do vírus, por exemplo, o gene de poliedrina, e colocada sob controle do promotor de poliedrina. A inserção bem sucedida do peptídeo de ligação multivalente tornará o gene de poliedrina inativo e produzirá vírus recombinante desprovido de proteína de revestimento. O vírus recombinante pode ser usado para infectar células de *S. frugiperda* ou larvas de *Trichoplusia* nas quais o peptídeo é

expresso (Smith e cols., *J. Virol.* 46: 584, 1983; Engelhard e cols., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3.224-7, 1994).

Em outro exemplo, a sequência de DNA que codifica o peptídeo de ligação multivalente pode ser amplificada por
5 PCR e clonada em um vetor apropriado, por exemplo, pGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, NJ). O vetor pGEX é projetado para produzir uma proteína de fusão que compreende glutathione-S-transferase (GST), codificada pelo vetor, e uma proteína de
ligação multivalente codificada por um fragmento de DNA
10 inserido no sítio de clonagem do vetor. Podem ser gerados iniciadores para a PCR para incluir, por exemplo, um sítio de clivagem apropriado. Quando a proteína de ligação multivalente for usada exclusivamente para facilitar a expressão da porção de fusão ou for de algum modo
15 indesejável como adesão ao peptídeo de interesse, a fusão da proteína de ligação multivalente recombinante poderá então ser clivada da porção GST da proteína de fusão. A construção de pGEX-3X/peptídeo de ligação multivalente é transformada em células de *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene,
20 La Jolla CA), e os transformantes individuais são isolados e desenvolvidos. O DNA de plasmídeo de transformantes individuais é purificado, e pode ser parcialmente seqüenciado com o uso de um seqüenciador automatizado para confirmar a presença da inserção do ácido nucléico que
25 codifica a proteína de ligação multivalente desejado na orientação adequada.

A proteína de ligação multivalente fundida, que pode ser produzida como um corpo de inclusão insolúvel nas bactérias, pode ser purificada da seguinte forma. As
30 células hospedeiras podem ser coletadas por centrifugação;

lavadas em NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; e tratadas com lisozima 0,1 mg/ml (Sigma Chemical Co.) por 15 minutos em temperatura ambiente. O lisado pode ser depurado por sonificação, e os restos de células podem ser
5 peletizados por centrifugação por 10 minutos a 12.000 X g. O pélete que contém a proteína de ligação multivalente fusão pode ser ressuspenso em Tris 50 mM, pH 8 e EDTA 10 mM, estratificado sobre glicerol 50%, e centrifugado por 30 minutos a 6.000 g. O pélete pode ser ressuspenso em solução
10 salina tamponada com fosfato (PBS) padronizada sem Mg^{++} e Ca^{++} . A fusão da proteína de ligação multivalente pode ser adicionalmente purificada por fracionamento do pélete ressuspenso em um gel de poliacrilamida desnaturante SDS (Sambrook e cols.). O gel é embebido em KCl 0,4 M para
15 visualizar a proteína, que é removida e eluída eletricamente em tampão de processamento em gel desprovido de SDS. Caso a proteína de fusão de GST/peptídeo de ligação multivalente seja produzida em bactérias como uma proteína solúvel, ela poderá ser purificada com o uso do Módulo de
20 Purificação de GST (Pharmacia Biotech).

A fusão da proteína de ligação multivalente é preferivelmente submetida à digestão para clivagem da GST do peptídeo de ligação multivalente da invenção. A reação de digestão (20-40 µg de proteína de fusão, 20-30 unidades
25 de trombina humana (4000 U/mg (Sigma) em 0,5 ml de PBS)) pode ser incubada 16-48 horas em temperatura ambiente e carregada em um gel de SDS-PAGE desnaturante para fracionar os produtos de reação. O gel pode ser embebido em KCl 0,4 M para visualizar as bandas de proteína. A identidade da
30 banda de proteína que corresponde ao peso molecular

esperado do peptídeo de ligação multivalente pode ser confirmada por análise da seqüência de aminoácidos com a utilização de um seqüenciador automatizado (Applied Biosystems Modelo 473A, Foster City, CA). Alternativamente, a identidade pode ser confirmada realizando-se HPLC e/ou espectrometria de massa dos peptídeos.

Alternativamente, uma seqüência de DNA que codifica o peptídeo de ligação multivalente pode ser clonada em um plasmídeo que contém um promotor desejado e, opcionalmente, uma seqüência líder (veja, por exemplo, Better e cols., *Science*, 240: 1.041-43, 1988). A seqüência dessa construção pode ser confirmada por seqüenciamento automatizado. O plasmídeo pode então ser transformado em uma cepa de *E. coli* adequada, por exemplo, a cepa MC1061, usando procedimentos padronizados que empregam incubação com CaCl_2 e tratamento por choque térmico das bactérias (Sambrook e cols.). As bactérias transformadas podem crescer em meio LB suplementado com carbenicilina ou outra forma adequada de seleção, como é conhecido na técnica, e a produção da proteína expressa pode ser induzida por crescimento em um meio adequado. Se presente, a seqüência líder pode efetuar a secreção do peptídeo de ligação multivalente e ser clivada durante a secreção. A proteína recombinante secretada pode ser purificada do meio de cultura bacteriana pelos métodos aqui descritos abaixo.

Sistemas hospedeiros mamíferos para a expressão da proteína recombinante são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica, e são os sistemas preferidos. Podem ser escolhidas cepas de células hospedeiras para uma habilidade específica para processar a proteína expressa ou

produzir certas modificações pós-tradução que serão úteis na geração da atividade da proteína. Essas modificações do polipeptídeo incluem, sem limitação, acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação e
5 acilação. Diferentes células hospedeiras como, por exemplo, células CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, e semelhantes, possuem maquinário celular e mecanismos característicos específicos para essas atividades pós-tradução, e podem ser escolhidas para assegurar modificação e processamento corretos da
10 proteína estanha.

É preferível que as células transformadas sejam usadas para a produção de longo prazo, de alto rendimento, de proteína e, dessa forma, é desejável a expressão estável. Após essas células serem transformadas com vetores que
15 preferivelmente contêm pelo menos um marcador selecionável juntamente com o cassete de expressão desejado, as células crescem por 1-2 dias em um meio enriquecido, antes de serem movidas para o meio seletivo. O marcador selecionável é projetado para conferir resistência à seleção, e sua
20 presença permite o crescimento e a recuperação de células que expressam com sucesso a proteína estanha. Os agrupamentos resistentes de células transformadas de forma estável podem ser proliferados com a utilização de técnicas de cultura de tecido adequadas à célula.

25 Podem ser usados diversos sistemas de seleção para recuperar as células que foram transformadas para a produção da proteína recombinante. Esses sistemas de seleção incluem, sem limitação, genes de timidina quinase de HSV, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase e
30 adenina fosforibosiltransferase, em células tk, hgp^rt ou

aprt, respectivamente. Além disso, a resistência anti-metabólito pode ser usada como base da seleção para *dhfr*, que confere resistência ao metotrexato; *gpt*, que confere resistência ao ácido micofenólico; *neo*, que confere
5 resistência ao aminoglicosídeo G418 e confere resistência ao clorsulfuron; e *hygro*, que confere resistência à higromicina. Genes selecionáveis adicionais que podem ser úteis incluem *trpB*, que permite que as células utilizem indol no lugar de triptofano, ou *hisD*, que permite que as
10 células utilizem histinol no lugar de histidina. Marcadores que dão uma indicação visual para a identificação de transformantes incluem antocianinas, β -glucuronidase e seu substrato, GUS, e luciferase e seu substrato, luciferina.

Purificação de proteínas

15 Técnicas de purificação de proteínas são bem conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Essas técnicas envolvem, em um nível, o fracionamento bruto das frações polipeptídicas e não polipeptídicas. Após a separação do polipeptídeo de ligação multivalente de pelo
20 menos outra proteína, o polipeptídeo de interesse é purificado, mas freqüentemente é interessante a purificação adicional com o uso de técnicas cromatográficas e eletroforéticas para se obter a purificação parcial ou completa (ou purificação até a homogeneidade). Métodos
25 analíticos particularmente adequados à preparação de um peptídeo de ligação multivalente puro são cromatografia por troca iônica, cromatografia por exclusão; eletroforese em gel de poliacrilamida e concentração isoelétrica. Métodos de purificação de peptídeos particularmente eficientes são
30 cromatografia líquida rápida de proteína e HPLC.

Certos aspectos da presente invenção estão relacionados à purificação e, em modalidades específicas, a purificação substancial de uma proteína codificada ou peptídeo de ligação multivalente. O termo "proteína ou
5 peptídeo de ligação multivalente purificado", como aqui usado, visa se referir a uma composição, isolável de outros componentes, em que a proteína ou o peptídeo de ligação multivalente é purificado em qualquer grau em relação ao seu estado obtenível naturalmente. Uma proteína ou peptídeo
10 de ligação multivalente purificado, portanto, também se refere a uma proteína ou a um peptídeo de ligação multivalente, livre do ambiente no qual ocorre naturalmente.

Geralmente, "purificado" refere-se a uma composição de
15 proteína de ligação multivalente que foi submetida ao fracionamento para remover vários outros componentes, e cuja composição substancialmente retém sua atividade biológica expressa. Quando é usado o termo "substancialmente purificado", essa designação refere-se a
20 uma composição de proteína de ligação multivalente na qual a proteína ou o peptídeo de ligação multivalente forma o componente principal da composição, por exemplo, constituindo cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 99% ou
25 mais da proteína, por peso, na composição.

Vários métodos para a quantificação do grau de purificação da proteína de ligação multivalente serão do conhecimento daqueles habilitados na técnica à luz da presente especificação. Esses incluem, por exemplo, a
30 determinação da atividade de ligação específica de uma

fração ativa, ou por avaliação da quantidade de polipeptídeos de ligação multivalentes dentro de uma fração por análise SDS/PAGE. Um método preferido para avaliação da pureza de uma fração de proteína de ligação multivalente é
5 pelo cálculo da atividade de ligação da fração, para compará-lo com a atividade de ligação do extrato inicial e, dessa forma, calcular o grau de purificação, aqui avaliado por um "número de vezes de purificação". As unidades reais usadas para representar a quantidade de atividade de
10 ligação dependerão, evidentemente, da técnica de ensaio em particular escolhida para acompanhar a purificação e se a proteína ou o peptídeo de ligação multivalente expresso exibe ou não uma atividade de ligação detectável.

Várias técnicas adequadas ao uso na purificação de
15 proteínas de ligação multivalentes são bem conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Essas incluem, por exemplo, precipitação com sulfato de amônio, PEG, anticorpos, e semelhantes, ou desnaturação por aquecimento, seguida por centrifugação; etapas de cromatografia como, por exemplo,
20 cromatografia por troca iônica, filtração em gel, cromatografia de fase reversa, filtração com hidroxilapatita e por afinidade; concentração isoelétrica; eletroforese em gel; e combinações dessas e de outras técnicas. Como geralmente é conhecido na técnica, acredita-
25 se que a ordem de realização das várias etapas de purificação possa ser alterada, ou que certas etapas possam ser omitidas, e ainda resultem em um método adequado para a preparação de uma proteína de ligação multivalente substancialmente purificada.

30 Não há uma exigência geral de que a proteína de

ligação multivalente sempre seja fornecida em seu estado mais purificado. Na verdade, é contemplado que proteínas de ligação menos substancialmente multivalentes terão utilidade em certas modalidades. A purificação parcial pode
5 ser obtida com a utilização de menos etapas de purificação em combinação, ou pela utilização de formas diferentes do mesmo esquema geral de purificação. Por exemplo, observa-se que uma cromatografia em coluna de troca catiônica realizada com o uso de um aparelho de HPLC geralmente
10 resultará em uma purificação maior do que a mesma técnica utilizando um sistema de cromatografia de baixa pressão. Métodos que exibem um grau baixo de purificação relativa podem ter vantagens na recuperação total do produto de proteína de ligação multivalente, ou na manutenção da
15 atividade de ligação de uma proteína de ligação multivalente expressa.

Sabe-se que a migração de um polipeptídeo pode variar, algumas vezes significativamente, com diferentes condições de SDS/PAGE (Capaldi e cols., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*,
20 76:425, 1977). Será observado, portanto, que, sob diferentes condições de eletroforese, os pesos moleculares aparentes de produtos de expressão da proteína de ligação multivalente purificada ou parcialmente purificada podem variar.

25 Células efetoras

Células efetoras para a indução, por exemplo, de ADCC, ADCP (fagocitose celular dependente de anticorpo), e semelhantes, contra uma célula-alvo incluem leucócitos, macrófagos, monócitos, neutrófilos ativados, células
30 *natural killer* (NK) ativadas e eosinófilos humanos. Células

efetoras expressam Fc α R (CD89), Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, e/ou Fc ϵ R1 e incluem, por exemplo, monócitos e neutrófilos ativados. Verificou-se que a expressão de Fc γ RI, por exemplo, é supra-regulada por interferon gama (IFN- γ). Essa
5 expressão intensificada aumenta a atividade citotóxica de monócitos e neutrófilos contra células-alvo. Conseqüentemente, as células efetoras podem ser ativadas com (IFN- γ) ou com outras citocinas (por exemplo, TNF- α ou β , fator de estimulação de colônias, IL-2) para aumentar a
10 presença de Fc γ RI na superfície das células, antes de elas serem colocadas em contato com uma proteína multivalente da invenção.

As proteínas multivalentes da invenção fornecem uma função efetora de anticorpo, por exemplo, citotoxicidade
15 mediada por células efetoras dependente de anticorpos (ADCC), para uso contra uma célula-alvo. Proteínas multivalentes com função efetora são administradas isoladamente, como aqui ensinado, ou após serem acopladas a uma célula efetora, formando, dessa forma, uma "célula
20 efetora ativada". Uma "célula efetora ativada" é uma célula efetora, como aqui definida, ligada a uma proteína multivalente com função efetora, também como aqui definida, de tal forma que a célula efetora seja fornecida eficazmente com uma função de direcionamento, antes da
25 administração.

Células efetoras ativadas são administradas *in vivo* como uma suspensão de células em uma solução fisiologicamente aceitável. O número de células administradas está na ordem de 10^8 - 10^9 , mas irá variar,
30 dependendo da finalidade terapêutica. Em geral, a

quantidade será suficiente para obter localização da célula efetora na célula-alvo, e para fornecer um nível desejado de função da célula efetora naquele local, por exemplo, morte celular por ADCC e/ou fagocitose. O termo "solução fisiologicamente aceitável", como aqui usado, visa incluir qualquer solução de veículo que estabilize as células efetoras direcionadas para administração *in vivo*, incluindo, por exemplo, solução salina e soluções-tampão aquosas, solventes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos, e semelhantes.

Conseqüentemente, outro aspecto da invenção fornece um método de indução de uma função efetora específica de anticorpo, por exemplo, ADCC, contra uma célula em um indivíduo, que compreende a administração ao indivíduo de uma proteína multivalente (ou do ácido nucléico codificador) ou de célula efetora ativada em um meio fisiologicamente aceitável. As vias de administração podem variar, e as vias de administração adequadas serão determinadas por aqueles habilitados na técnica considerando-se as variáveis específicas do caso e procedimentos de rotina, como é conhecido na técnica.

Efeitos independentes de células

Também são fornecidos efeitos independentes de células pelas moléculas multivalentes da invenção, por exemplo, fornecendo-se uma funcionalidade de CDC. O sistema complemento é uma cascata bioquímica do sistema imunológico que ajuda a depurar materiais estranhos como, por exemplo, patógenos, de um organismo. Ele é derivado de proteínas plasmáticas muito pequenas que trabalham em conjunto na indução de citólise de uma célula-alvo por ruptura da

membrana plasmática da célula-alvo. O sistema complemento consiste em mais de 35 proteínas solúveis e ligadas à célula, 12 das quais estão diretamente envolvidas nas vias do complemento. As proteínas estão ativas em três vias bioquímicas que levam à ativação do sistema complemento: a via clássica do complemento, a via alternativa do complemento, e a via de lectina de ligação de manose. Anticorpos, em particular a classe IgG1, também podem "fixar" complemento. Uma descrição detalhada dessas vias pode ser obtida na técnica, e não será repetida nesta especificação, mas vale ressaltar que a citotoxicidade dependente de complemento não depende da interação de uma molécula de ligação com uma célula, por exemplo, uma célula B, do sistema imunológico. Também vale ressaltar que o sistema complemento é regulado por proteínas de regulação do complemento. Essas proteínas estão presentes em concentrações maiores no plasma do sangue do que as proteínas do complemento. As proteínas de regulação do complemento são encontradas nas superfícies de células *self*, fornecendo um mecanismo para evitar que as células *self* sejam visadas pelas proteínas do complemento. Supõe-se que o sistema complemento participe de várias doenças com um componente imune, por exemplo, síndrome de Barraquer-Simons, doença de Alzheimer, asma, lúpus eritematoso, várias formas de artrite, doença cardíaca autoimune e esclerose múltipla. Deficiências na via terminal predispoem um indivíduo tanto a doenças autoimunes quanto a infecções (particularmente meningite).

Doenças, distúrbios e condições

A invenção fornece as proteínas de ligação

multivalentes com função efetora, e variantes e derivados destas, que se ligam a um ou mais parceiros de ligação, e esses eventos de ligação são úteis no tratamento, prevenção ou atenuação de um sintoma associado a uma doença, 5 distúrbio ou condição patológica, preferivelmente que aflige seres humanos. Em modalidades preferidas desses métodos, a proteína de ligação multivalente (e multiespecífica) com função efetora associa uma célula que abriga um alvo, por exemplo, um marcador da superfície 10 celular tumor-específico, a uma célula efetora, por exemplo, uma célula do sistema imunológico que exibe atividade citotóxica. Em outras modalidades, a proteína de ligação multivalente, multiespecífica, com função efetora se liga especificamente a dois marcadores da superfície 15 celular diferentes específicos para uma doença ou um distúrbio ou uma condição, para assegurar que o alvo correto está associado a uma célula efetora, por exemplo, uma célula citotóxica do sistema imunológico. Adicionalmente, a proteína de ligação multivalente com 20 função efetora pode ser usada para induzir ou aumentar a atividade do antígeno, ou para inibir a atividade do antígeno. As proteínas de ligação multivalentes com função efetora também são adequadas às terapias combinadas e a regimes paliativos.

25 Em um aspecto, a presente invenção fornece composições e métodos úteis para o tratamento ou prevenção de doenças e condições caracterizadas por níveis aberrantes de atividade do antígeno associados a uma célula. Essas doenças incluem cânceres e outras condições hiperproliferativas, por 30 exemplo, hiperplasia, psoríase, dermatite de contato,

distúrbios imunológicos e infertilidade. Uma ampla variedade de cânceres, incluindo tumores sólidos e leucemias, responde às composições e aos métodos aqui revelados. Os tipos de câncer que podem ser tratados

5 incluem, sem limitação: adenocarcinoma da mama, próstata e cólon; todas as formas de carcinoma broncogênico do pulmão; mielóide; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; branquioma; síndrome carcinóide maligna; doença cardíaca carcinóide; e carcinoma (por

10 exemplo, Walker, de células basais, baso-escamoso, de Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, Krebs 2, de célula de Merkel, mucinoso, pulmonar de pequenas células, oat cells, papilar, fibroso, bronquiolar, broncogênico, de células escamosas e de células transicionais). Tipos de

15 cânceres adicionais que podem ser tratados incluem: distúrbios histiocíticos; leucemia; histiocitose maligna; doença de Hodgkin; pequena imunoproliferativa; linfoma não Hodgkin; plasmacitoma; reticuloendoteliose; melanoma; condroblastoma; condroma; condrossarcoma; fibroma;

20 fibrossarcoma; tumores de células gigantes; histiocitoma; lipoma; lipossarcoma; mesotelioma; mixoma; mixossarcoma; osteoma; osteossarcoma; cordoma; craniofaringioma; desgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefoma; miossarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma;

25 timoma; tumor trofoblástico. Além disso, os seguintes tipos de cânceres também são contemplados como sensíveis ao tratamento: adenoma; colangioma; colesteatoma; ciclindroma; cistadenocarcinoma; cistadenoma; tumor de células granulosas; ginandroblastoma; hepatoma; hidradenoma; tumor

30 de células da ilhota; tumor de células de Leydig; papiloma;

tumor de células de Sertoli; tumor de células da teca; leiomioma; leiomiossarcoma; mioblastoma; mioma; miossarcoma; rabdomioma; rabdomiossarcoma; ependimoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; 5 neurilemoma; neuroblastoma; neuroepitelioma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma não cromafina. Os tipos de cânceres que podem ser tratados também incluem, sem limitação, angioceratoma; hiperplasia angiolímfóide com eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatose; 10 glomangioma; hemangioendotelioma; hemangioma; hemangiopericitoma; hemangiossarcoma; linfangioma; linfangiomioma; linfangiossarcoma; pinealoma; carcinossarcoma; condrossarcoma; cistossarcoma filóide; fibrossarcoma; hemangiossarcoma; leiomiossarcoma; 15 leucossarcoma; lipossarcoma; linfangiossarcoma; miossarcoma; mixossarcoma; carcinoma ovariano; rabdomiossarcoma; sarcoma; neoplasmas; neurofibromatose; e displasia cervical. A invenção ainda fornece composições e métodos úteis no tratamento de outras condições nas quais 20 as células tornaram-se imortalizadas ou hiperproliferativas em decorrência da expressão anormalmente elevada de antígeno.

Exemplos dos diversos distúrbios hiperproliferativos que respondem às composições e aos métodos da invenção 25 cânceres de células B incluem linfomas de células B (por exemplo, várias formas de doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin (NHL) ou linfomas do sistema nervoso central), leucemias (por exemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia de células 30 pilosas e leucemia mieloblástica crônica) e mielomas (por

exemplo, mieloma múltiplo). Cânceres de células B adicionais incluem pequeno linfoma linfocítico, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma da zona marginal esplênica, mieloma de células
 5 plasmáticas, plasmocitoma solitário dos ossos, plasmocitoma extra-ósseo, linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (MALT), linfoma de células B da zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de células do manto, linfoma difuso de
 10 células B grandes, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusão primária, linfoma/leucemia de Burkitt, proliferações de células B de potencial maligno incerto, granulomatose linfomatóide e distúrbio linfoproliferativo
 15 pós-transplante.

Distúrbios caracterizados por produção de auto-anticorpos são freqüentemente considerados doenças autoimunes. Doenças autoimunes incluem, sem limitação: artrite, artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil,
 20 osteoartrite, policondrite, artrite psoriática, psoríase, dermatite, polimiosite/dermatomiosite, miosite por corpo de inclusão, miosite inflamatória, necrólise epidérmica tóxica, esclerodermia e esclerose sistêmicas, síndrome CREST, respostas associadas à doença inflamatória do
 25 intestino, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome do sofrimento respiratório, síndrome do sofrimento respiratório do adulto (ARDS), meningite, encefalite, uveíte, colite, glomerulonefrite, condições alérgicas, eczema, asma, condições que envolvem infiltração de células
 30 T e respostas inflamatórias crônicas, aterosclerose,

miocardite autoimune, deficiência de adesão leucocitária, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), lúpus eritematoso cutâneo subagudo, lúpus discóide, mielite lúpica, cerebrite lúpica, diabetes de surgimento juvenil, esclerose múltipla, 5 encefalomielite alérgica, neuromielite óptica, febre reumática, coréia de Sydenham, respostas imunes associadas à hipersensibilidade aguda e retardada mediada por citocinas e linfócitos T, tuberculose, sarcoidose, granulomatose, incluindo granulomatose de Wegener e doença 10 de Churg-Strauss, agranulocitose, vasculite (incluindo vasculite/angeíte por hipersensibilidade, ANCA e vasculite reumatóide), anemia aplásica, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica imune, incluindo anemia hemolítica autoimune (AIHA), anemia perniciosa, aplasia pura de 15 células vermelhas (PRCA), deficiência de Fator VIII, hemofilia A, neutropenia autoimune, pancitopenia, leucopenia, doenças que envolvem diapedese de leucócitos, distúrbios inflamatórios do sistema nervoso central (SNC), síndrome de lesão de múltiplos órgãos, miastenia gravis, 20 doenças mediadas por complexo antígeno-anticorpo, doença da membrana basal anti-glomerular, síndrome do anticorpo anti-fosfolipídeo, neurite alérgica, doença de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miastênica de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjörgen, 25 síndrome de Stevens-Johnson, rejeição de transplantes de órgãos sólidos, doença enxerto versus hospedeiro (GVHD), penfigóide bolhoso, pênfigo, poliendocrinopatias autoimune, espondiloartropatias soro-negativas, doença de Reiter, síndrome *stiff-man*, arterite de células gigantes, nefrite 30 por complexo imune, nefropatia por IgA, polineuropatias por

IgM ou neuropatia mediada por IgM, púrpura trombocitopênica idiopática (ITP), púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), púrpura de Henoch-Schonlein, trombocitopenia autoimune, doença autoimune dos testículos e do ovário, 5 incluindo orquite e ooforite autoimune, hipotireoidismo primário; doenças endócrinas autoimunes, incluindo tireoidite autoimune, tireoidite crônica (tireoidite de Hashimoto), tireoidite subaguda, hipotireoidismo idiopático, doença de Addison, doença de Grave, síndromes 10 poliglandulares autoimunes (ou síndromes de endocrinopatia poliglandular), diabetes do Tipo I, também chamado diabetes melito insulino-dependente (IDDM) e síndrome de Sheehan; hepatite autoimune, pneumonite linfóide intersticial (HIV), bronquiolite obliterante (não transplante) vs. NSIP, 15 síndrome de Guillain-Barré, vasculite de grandes vasos (incluindo polimialgia reumática e arterite de células gigantes (de Takayasu)), vasculite de vasos médios (incluindo doença de Kawasaki e poliarterite nodosa), poliarterite nodosa (PAN), espondilite anquilosante, doença 20 de Berger (nefropatia por IgA), glomerulonefrite rapidamente progressiva, cirrose biliar primária, psilose celíaca (enteropatia por glúten), crioglobulinemia, crioglobulinemia associada à hepatite, esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença da artéria coronária, febre 25 familiar do Mediterrâneo, poliangeíte microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott-Aldrich e tromboangeíte obliterante.

A artrite reumatóide (RA) é uma doença crônica caracterizada por inflamação das articulações, levando a 30 edema, dor e perda de função. Pacientes que possuem RA por

um período de tempo prolongado normalmente exibem destruição articular progressiva, deformidade, incapacidade e até mesmo morte prematura. Além da RA, doenças, distúrbios e condições inflamatórias em geral são passíveis
5 de tratamento, prevenção ou atenuação dos sintomas (por exemplo, calor, dor, edema, vermelhidão) associados ao processo de inflamação, e as composições e os métodos da invenção são benéficos no tratamento, prevenção ou atenuação de processos inflamatórios aberrantes ou
10 anormais, incluindo RA.

A doença de Crohn e uma doença relacionada, a colite ulcerativa, são as duas categorias principais de doenças que pertencem a um grupo de enfermidades denominado "doença inflamatória do intestino" (IBD). A doença de Crohn é um
15 distúrbio crônico que causa inflamação do trato digestivo ou gastrintestinal (GI). Embora possa envolver qualquer área do trato GI da boca ao ânus, ela afeta mais comumente o intestino delgado e/ou cólon. Na colite ulcerativa, o envolvimento GI limita-se ao cólon. A doença de Crohn pode
20 ser caracterizada por anticorpos contra antígenos de neutrófilos, ou seja, pelo "anticorpo perinuclear anti-neutrófilo" (pANCA) e *Saccharomyces cerevisiae*, ou seja, o "anticorpo anti-*Saccharomyces cerevisiae*" (ASCA). Muitos pacientes com colite ulcerativa possuem o anticorpo pANCA
25 no sangue, mas não o anticorpo ASCA, enquanto muitos pacientes com doença de Crohn exibem anticorpos ASCA, e não anticorpos pANCA. Um método de avaliar a doença de Crohn é a utilização do Índice de Atividade de Doença de Crohn (CDAI), com base nas pontuações de 18 variáveis
30 prognósticas coletadas pelos médicos. Valores do CDAI

iguais ou inferiores a 150 estão associados à doença quiescente; valores acima indicam doença ativa, e valores acima de 450 são observados em casos da doença extremamente graves [Best e cols., "Development of a Crohn's disease activity index". *Gastroenterology* 70: 439-444 (1976)]. No
5 entanto, desde o estudo original, alguns pesquisadores usam um "valor subjetivo" de 200 a 250 como uma pontuação saudável.

O lúpus eritematoso sistêmico (SLE) é uma doença
10 autoimune causada por lesões recorrentes aos vasos sangüíneos em vários órgãos, incluindo os rins, a pele e articulações. Nos pacientes com SLE, uma interação defeituosa entre células T e células B resulta na produção de auto-anticorpos que atacam o núcleo das células. Há uma
15 concordância geral de que os auto-anticorpos são responsáveis pelo SLE e, portanto, novas terapias que eliminem a linhagem de células B, permitindo que o sistema imunológico seja reiniciado com novas células B geradas por precursores, dariam esperanças para um benefício de longo
20 prazo em pacientes com SLE.

A esclerose múltipla (MS) também é uma doença autoimune. Ela é caracterizada por inflamação do sistema nervoso central e destruição de mielina, que isola as fibras das células nervosas no cérebro, na medula vertebral
25 e no corpo. Embora a causa da MS seja desconhecida, é amplamente aceito que células T autoimunes sejam contribuintes primários para a patogênese da doença. No entanto, níveis elevados de anticorpos estão presentes no líquido cefalorraquidiano de pacientes com MS, e algumas
30 teorias prevêem que a resposta de células B que leva à

produção de anticorpos seja importante para mediação da doença.

A doença tireoidiana autoimune decorre da produção de auto-anticorpos que estimulam a tireóide a causar hipertireoidismo (doença de Graves) ou destroem a tireóide, causando hipotireoidismo (tireoidite de Hashimoto). A estimulação da tireóide é causada por auto-anticorpos que se ligam e ativam o receptor do hormônio estimulante da tireóide (TSH). A destruição da tireóide é causada por auto-anticorpos que reagem com outros antígenos da tireóide.

Doenças, distúrbios e condições adicionais sensíveis aos benefícios fornecidos pelas composições e pelos métodos da invenção incluem síndrome de Sjögren, que é uma doença autoimune caracterizada por destruição das glândulas produtoras de umidade do corpo. Além disso, a púrpura trombocitopênica imune (ITP) é causada por auto-anticorpos que se ligam às plaquetas sanguíneas e causam sua destruição, e essa condição é adequada à aplicação dos materiais e métodos da invenção. A miastenia gravis (MG), um distúrbio neuromuscular autoimune crônico caracterizado por auto-anticorpos que se ligam aos receptores de acetilcolina expressos em junções neuromusculares, levando à fraqueza dos grupos musculares voluntários, é uma doença que possui sintomas que são tratáveis com o uso da composição e dos métodos da invenção, e espera-se que a invenção seja benéfica no tratamento e/ou na prevenção de MG. Além disso, espera-se que infecções pelo vírus do sarcoma de Rous sejam passíveis de tratamento ou atenuação de pelo menos um sintoma, com as composições e os métodos

da invenção.

Outro aspecto da presente invenção é a utilização dos materiais e métodos da invenção para evitar e/ou tratar qualquer condição hiperproliferativa da pele, incluindo psoríase e dermatite de contato ou outras doenças hiperproliferativas. Por exemplo, a psoríase, que é caracterizada por inflamação autoimune da pele e também está associada à artrite em 30% dos casos, bem como esclerodermia, doença inflamatória do intestino, incluindo doença de Crohn e colite ulcerativa. Foi demonstrado que pacientes com psoríase e dermatite de contato possuem atividade elevada do antígeno dentro dessas lesões (Ogoshi e cols., *J. Inv. Dermatol.*, 110: 818-23 [1998]). As proteínas de ligação multivalentes e multiespecíficas podem liberar uma célula citotóxica do sistema imunológico, por exemplo, diretamente às células dentro das lesões que expressam níveis elevados de antígeno. As proteínas de ligação multivalentes, por exemplo, multiespecíficas, podem ser administradas por via subcutânea nas vizinhanças das lesões, ou com a utilização das diversas vias de administração aqui descritas, e de outras que são conhecidas por aqueles habilitados na técnica.

Também é contemplado o tratamento de miopatia inflamatória idiopática (IIM), incluindo dermatomiosite (DM) e polimiosite (PM). As miopatias inflamatórias foram categorizadas com a utilização de diversos esquemas de classificação. O esquema de classificação de Miller (Miller, *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 20: 811-826, 1994) identifica 2 miopatias inflamatórias idiopáticas (IIM), polimiosite (PM) e dermatomiosite (DM).

A polimiosite e a dermatomiosite são doenças inflamatórias crônicas, debilitantes, que envolvem os músculos e, no caso de DM, a pele. Esses distúrbios são raros, com uma incidência anual relatada de aproximadamente 5 a 10 casos por milhão de adultos, e de 0,6 a 3,2 casos por milhão de crianças por ano nos Estados Unidos (Targoff, *Curr. Probl. Dermatol.* 1991, 3: 131-180). A miopatia inflamatória idiopática está associada a morbidade e mortalidade significativas, com até metade dos adultos afetados apresentando um grau de invalidez importante (Gottdiener e cols., *Am. J. Cardiol.* 1978, 41: 1.141-49). Miller (*Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1994, 20: 811-826 e "Arthritis and Allied Conditions", Capítulo 75, Eds. Koopman e Moreland, Lippincott Williams e Wilkins, 2005) define cinco grupos de critérios usados para o diagnóstico de MII, ou seja, avaliação dos Critérios para Miopatia Inflamatória Idiopática (IIMC), incluindo fraqueza muscular, evidências de degeneração na biópsia, elevação dos níveis séricos de enzimas associadas aos músculos, tríade eletromagnética de miopatia, evidências de erupções na dermatomiosite, e também inclui evidências de auto-anticorpos como critérios secundários.

Fatores associados à MII, incluindo enzimas associadas aos músculos e auto-anticorpos, incluem, sem limitação, creatina quinase (CK), lactato desidrogenase, aldolase, proteína C-reativa, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e auto-anticorpo antinuclear (ANA), anticorpos específicos para miosite (MSA) e anticorpo para antígenos nucleares extraíveis.

Doenças autoimunes preferidas sensíveis aos métodos da

invenção incluem doença de Crohn, síndrome de Guillain-Barré (GBS; também conhecida como polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda, polirradiculoneurite idiopática aguda, polineurite idiopática aguda e paralisia ascendente de Landry), lúpus eritematoso, esclerose múltipla, miastenia gravis, neurite óptica, psoríase, artrite reumatóide, hipertireoidismo (por exemplo, doença de Graves), hipotireoidismo (por exemplo, doença de Hashimoto), tireoidite de Ord (uma tireoidite similar à doença de Hashimoto), diabetes melito (tipo 1), anemia aplásica, síndrome de Reiter, hepatite autoimune, cirrose biliar primária, síndrome do anticorpo antifosfolípideo (APS), síndrome de opsoclônus mioclônus (OMS), arterite temporal (também conhecida como "arterite de células gigantes"), encefalomielite aguda disseminada (ADEM), síndrome de Goodpasture, granulomatose de Wegener, doença celíaca, pênfigo, poliartrite canina, anemia hemolítica autoimune quente. Além disso, a invenção contempla métodos para o tratamento ou atenuação de um sintoma associado às seguintes doenças: endometriose, cistite intersticial, neuromiotonia, esclerodermia, vitiligo, vulvodinia, doença de Chagas que causa cardiopatia chagásica (cardiomegalia), sarcoidose, síndrome da fadiga crônica e disautonomia.

Acredita-se que o sistema complemento participe de muitas doenças com um componente imune, por exemplo, doença de Alzheimer, asma, lúpus eritematoso, várias formas de artrite, doença cardíaca autoimune e esclerose múltipla, todas contempladas como doenças, distúrbios ou condições passíveis de tratamento ou de atenuação de sintomas com o uso dos métodos de acordo com a invenção.

Certas sub-regiões constantes são preferidas, dependendo da função ou funções efetoras específicas a serem exibidas por uma molécula de ligação multivalente de cadeia simples. Por exemplo, IgG (IgG1, 2 ou 3) e IgM são
5 preferidas para ativação de complemento, IgG de qualquer subtipo é preferida para opsonização e neutralização de toxinas; IgA é preferida para ligação a patógenos; e IgE para ligação de parasitas como, por exemplo, vermes.

Como exemplo, FcRs que reconhecem a região constante
10 de anticorpos IgG foram encontrados em leucócitos humanos como três tipos distintos de receptores Fcγ, que são distinguíveis por propriedades estruturais e funcionais, bem como por estruturas antigênicas detectadas por anticorpos monoclonais CD. Eles são conhecidos como FcγRI,
15 FcγRII e FcγRIII, e são expressos diferencialmente em subconjuntos (sobrepostos) de leucócitos.

FcγRI (CD64), um receptor de alta afinidade expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos, precursores mielóides e células dendríticas, é composto pelas isoformas
20 Ia e Ib. FcγRI possui uma afinidade elevada por IgG1 humana monomérica e IgG3. Sua afinidade por IgG4 é cerca de 10 vezes menor, e não se liga à IgG2. FcγRI não apresenta polimorfismo genético.

FcγRII (CD32), composta pelas isoformas IIa, IIb1,
25 IIb2, IIb3 e IIc, é o tipo de FcγR humano mais amplamente distribuído, sendo expresso na maioria dos tipos de leucócitos sangüíneos, bem como em células de Langerhans, células dendríticas e plaquetas. FcγRII é um receptor de baixa afinidade que só se liga à IgG agregada. É a única
30 classe de FcγR capaz de se ligar à IgG2. FcγRIIa mostra

polimorfismo genético, resultando em dois alótipos distintos, FcγRIIa-H131 e FcγRIIa-R131, respectivamente. Esse polimorfismo funcional é atribuível a uma única diferença de aminoácido: um único resíduo de histidina (H) ou uma arginina (R) na posição 131, que é crítica para a ligação à IgG. FcγRIIa se liga prontamente a IgG e IgG3 humanas, e parece que não se liga à IgG4. O FcγRIIa-H131 possui uma afinidade bem maior para IgG2 em complexo do que o alótipo FcγRIIa-R131.

10 FcγRIII (CD16) possui duas isoformas ou tipos alélicos, ambos capazes de se ligar a IgG1 e IgG3. O FcγRIIa, com uma afinidade intermediária por IgG, é expresso em macrófagos, monócitos, células natural killer (NK) e subconjuntos de células T.

15 FcγRIIIb é um receptor de baixa afinidade por IgG, expresso seletivamente em neutrófilos. É um receptor altamente móvel, com colaboração eficiente com outros receptores da membrana. Estudos com dímeros de IgG de mieloma demonstraram que apenas IgG1 e IgG3 se ligam ao FcγRIIIb (com baixa afinidade), enquanto não foi verificada
20 ligação com IgG2 e IgG4. O FcγRIIIb abriga um polimorfismo co-dominante, bi-alélico, com os alótipos sendo designados NA1 (antígeno de neutrófilo) e NA2.

Ainda outro aspecto da invenção é uso dos materiais e métodos da invenção para combater, ao tratar, evitar ou
25 atenuar, os efeitos de infecção resultante de qualquer um dentre diversos agentes infecciosos. As moléculas de ligação multiespecíficas e multivalentes da invenção são projetadas para recrutar eficiente e eficazmente o sistema
30 imunológico do organismo do hospedeiro para resistir à

infecção que surge em decorrência de um organismo estranho, uma célula estranha, um vírus estranho ou um objeto inanimado estranho. Por exemplo, uma molécula de ligação multiespecífica pode ter um domínio de ligação que se liga especificamente a um alvo em um agente infeccioso, outro domínio de ligação que se liga especificamente a um alvo em uma célula de apresentação de antígeno, por exemplo, CD 40, CD80, CD86, DC-SIGN, DEC-205, CD83, e semelhantes. Alternativamente, cada domínio de ligação de uma molécula de ligação multivalente pode se ligar especificamente a um agente infeccioso e, dessa forma, neutralizar mais eficazmente o agente. Além disso, a invenção contempla moléculas de ligação multivalentes e multiespecíficas que se ligam especificamente a um alvo em um agente infeccioso e a um parceiro de ligação não associado a uma célula, o que pode ser eficaz em conjunto com uma função efetora da molécula de ligação multiespecífica no tratamento ou na prevenção de infecção causada por um agente infeccioso.

Células infecciosas contempladas pela invenção incluem qualquer célula infecciosa conhecida, incluindo, sem limitação, qualquer uma dentre diversas bactérias (por exemplo, *E. coli* patogênica, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *B. anthracis*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *H. pylori*, *V. cholerae*, e semelhantes), micobactérias, micoplasma, fungos (incluindo levedura e bolores) e parasitas (incluindo qualquer membro parasítico conhecido entre protozoários, trematódeos, cestódeos e nematódeos). Vírus infecciosos incluem, sem limitação, vírus eucarióticos (por exemplo, adenovírus, buniavírus, herpesvírus, papovavírus, paramixovírus, picornavírus,

poxvírus, reovírus, retrovírus, e semelhantes), além de bacteriófagos. Objetos estranhos incluem objetos que entram em um organismo, preferivelmente um ser humano, independentemente do modo de entrada e independentemente de se há a intenção de ferir. Em função da prevalência crescente de agentes infecciosos resistentes a multifármacos (por exemplo, bactérias), particularmente como agentes etiológico de infecção hospitalar, os materiais e métodos da invenção fornecem uma abordagem de tratamento que evita as dificuldades impostas por resistência antibiótica crescente.

Doenças, condições ou distúrbios associados aos agentes infecciosos e passíveis de tratamento (profilático ou terapêutico) com os materiais e métodos aqui revelados incluem, sem limitação, antraz, aspergilose, meningite bacteriana, pneumonias bacterianas (por exemplo, pneumonias por clamídia), blastomicose, botulismo, brucelose, candidíase, cólera, coccidiomicose, criptococose, *E. coli* diarréica, êntero-hemorragica ou êntero-toxigênica, difteria, mormo, histoplasmose, legionelose, lepra, listeriose, nocardiose, pertussis, salmonelose, escarlatina, esporotricose, amidalite estreptocócica, síndrome do choque tóxico, diarréia do viajante e febre tifóide.

Aspectos e detalhes adicionais da invenção ficarão evidentes a partir dos exemplos que serão apresentados a seguir, que visam ser ilustrativos, e não limitantes. O Exemplo 1 descreve a clonagem recombinante de regiões variáveis de cadeia pesada e leve de imunoglobulina. O Exemplo 2 descreve a construção de pequenos produtos

imunofarmacêuticos modulares. O Exemplo 3 descreve a construção de um protótipo de cassete para uma proteína de ligação multivalente com função efetora. O Exemplo 4 descreve estudos de ligação e expressão com esse protótipo inicial da molécula. O Exemplo 5 descreve a construção de construções alternativas derivadas desse protótipo inicial da molécula, nas quais a sequência da região do ligante entre o EFD e BD2 foi alterada tanto no comprimento quanto na sequência. Além disso, ele descreve formas alternativas nas quais a orientação de regiões V no domínio de ligação 2 também foi alterada. O Exemplo 6 descreve estudos subseqüentes de ligação e funcionais sobre essas construções alternativas com formas variantes do ligante, que identificam a clivagem na região do ligante em várias dessas formas derivadas, e as novas variantes de sequência desenvolvidas para solucionar esse problema. O Exemplo 7 descreve a construção de uma modalidade preferida alternativa das proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas, nas quais BD1 e BD2 se ligam aos antígenos no mesmo tipo de célula (CD20 e CD37), ou outra proteína de fusão multiespecífica na qual a especificidade de ligação de antígeno para BD2 foi alterada para um CD3 humano, em vez de CD28. O Exemplo 8 descreve os estudos de ligação e funcionais realizados com as construções multiespecíficas CD20-hIgG-CD37. O Exemplo 9 descreve os estudos de ligação e funcionais com as construções da proteína de fusão multivalente CD20-hIgG-CD3. O Exemplo 10 revela moléculas de ligação multivalentes que possuem ligantes com base em regiões específicas dos domínios extracelulares de membros da superfamília das

imunoglobulinas. O Exemplo 11 revela ensaios para a identificação de domínios de ligação supostamente eficazes em moléculas de ligação multivalentes na obtenção de pelo menos um efeito benéfico identificado como estando
5 associado a essas moléculas (por exemplo, tratamento de doenças).

Exemplo 1

Clonagem de regiões variáveis de cadeia pesada e leve de imunoglobulina

10 Qualquer método conhecido na técnica pode ser usado para despertar anticorpos a certo alvo antigênico. Além disso, qualquer método conhecido na técnica pode ser usado para clonar as regiões variáveis da cadeia leve e/ou pesada de imunoglobulina, bem como a sub-região constante de um
15 anticorpo ou anticorpos. O método a seguir fornece um método de clonagem exemplar.

A. Isolamento de RNA total

Para clonar as regiões variáveis de cadeia pesada e leve de imunoglobulina, ou a sub-região constante, RNA
20 total é isolado de células de hibridoma que secretam o anticorpo apropriado. Células (2×10^7) da linhagem de células de hibridoma são lavadas com 1x PBS e peletizadas por meio de centrifugação em um tubo de polipropileno de 12 x 75 mm de fundo redondo (Falcon no. 2059). Reagente de
25 Isolamento de RNA Total TRIzol™ (Gibco BRL, Life Technologies, N° de catálogo 15596-018) é adicionado (8 ml) a cada tubo, e as células são lisadas por meio de pipetagem repetida. O lisado é incubado por 5 minutos em temperatura ambiente, antes da adição de 1,6 ml (0,2 x volume) de
30 clorofórmio e agitação vigorosa por 15 segundos. Após

repouso por 3 minutos em temperatura ambiente, os lisados são centrifugados a 9.000 rpm por 15 minutos em um rotor pré-resfriado a 4°C Beckman JA-17 a fim de separar as fases aquosas e orgânicas. A fase aquosa superior (cerca de 4,8
5 ml) é transferida para um novo tubo e misturada gentilmente com 4 ml de isopropanol. Após uma incubação de 10 minutos em temperatura ambiente, o RNA é precipitado por centrifugação a 9.000 rpm em um rotor JA-17 a 4°C por 11 minutos. O pélete de RNA é lavado com 8 ml de etanol 75%
10 gelado, e re-peletizado por centrifugação a 7.000 x rpm por 7 minutos em um rotor JA-17 a 4°C. O etanol lavado é decantado, e os péletes de RNA são secos ao ar por 10 minutos. Os péletes de RNA são ressuspensos em 150 µl de ddH₂O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) contendo 1 µl
15 de Inibidor RNase (N° de Catálogo 799017; Boehringer Mannheim/Roche) por 1 ml de ddH₂O tratada com DEPC. Os péletes são ressuspensos por pipetagem suave e são incubados por 20 minutos a 55°C. As amostras de RNA são quantificadas por medida da OD_{260 nm} de alíquotas diluídas
20 (1,0 unidade de OD_{260nm} = 40 µg/ml de RNA).

B. Amplificação rápida de extremidades de cDNA

É realizada RACE 5' para amplificar as extremidades das regiões variáveis de cadeia pesada e leve, ou da sub-região constante. O Sistema RACE 5' para o Kit para
25 Amplificação Rápida de Extremidades de cDNA versão 2.0 (Life Technologies, N° de Catálogo 18374-058) é usado de acordo com as instruções do fabricante. Iniciadores de oligonucleotídeos degenerados RACE 5' são projetados para combinar, por exemplo, com as regiões constantes das duas
30 classes comuns de cadeias pesadas de imunoglobulina de

camundongo (IgG1 e IgG2b) com a utilização do programa de projeto de oligonucleotídeos Oligo versão 5.1 (Molecular Biology Insights, Cascade CO). Também são projetados iniciadores para combinar com a região constante da cadeia leve de IgG kappa de camundongo. Essa é a única classe de cadeia leve de imunoglobulina e, portanto, não há necessidade de degeneração no projeto do iniciador. As seqüências dos iniciadores são as seguintes:

	Nome da seqüência	ID. DE SEQ. N°
10	<i>Cadeia pesada GSP1</i>	
	5' AGGTGCTGGAGGGGACAGTCACTGAGCTGC3'	7
	<i>Cadeia pesada abrigada</i>	
	5' GTCACWGTCACTGRCTCAGGGAARTAGC3'	8
	(W = A ou T; R = A ou G)	
15	<i>Cadeia leve GSP1</i>	
	5' GGGTGCTGCTCATGCTGTAGGTGCTGTCTTTGC3'	9
	<i>Cadeia leve abrigada</i>	
	5' CAAGAAGCACACGACTG	
	AGGCACCTCCAGATG 3'	10
20	<i>Iniciador de ancoragem abreviado RACE 5'</i>	
	5' GGCCACGCGTCGACTAGTACGG	
	GNNGGGNNGGGNNG 3'	11

Para amplificar o componente da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, a reação de transcriptase reversa é realizada em um tubo de PCR de paredes finas de 0,2 ml contendo 2,5 pmol de iniciador de cadeia pesada GSP1 (ID. DE SEQ. N°: 7), 4 µg de RNA total isolado de um clone de hibridoma adequado (por exemplo, clone 4A5 ou clone 4B5), e 12 µl de ddH₂O tratada com DEPC. Da mesma forma, para o componente de cadeia leve de camundongo, a reação de

transcriptase reversa é realizada em um tubo de PCR de paredes finas de 0,2 ml contendo 2,5 pmol de um iniciador de cadeia leve GSP1 (ID. DE SEQ. N°: 9), 4 µg de RNA total de um clone de hibridoma adequado (por exemplo, clone 4A5 ou clone 4B5), e 12 µl de ddH₂O tratada com DEPC.

As reações são realizadas em um ciclador térmico programável PTC-100 (MJ research Inc., Waltham, MA). A mistura é incubada a 70°C por 10 minutos para desnaturar o RNA, e depois resfriada em gelo úmido por 1 minuto. Os tubos são centrifugados brevemente a fim de coletar umidade das tampas dos tubos. Subseqüentemente, são adicionados os seguintes componentes à reação: 2,5 µl de 10x tampão de PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM), 2,5 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de mistura de dNTP 10 mM e 2,5 µl de DTT 0,1 M. Após mistura de cada tubo por pipetagem suave, os tubos são colocados em um ciclador térmico PTC-100 a 42°C por 1 minuto para pré-aquecer a mistura. Subseqüentemente, 1 µl (200 unidades) de Transcriptase Reversa SuperScript™ II (Gibco-BRL; N° de Catálogo 18089-011) é adicionado a cada tubo, misturado gentilmente por pipetagem, e incubado por 45 minutos a 42°C. As reações são cicladas até 70°C por 15 minutos para terminar a reação, e depois cicladas até 37°C. Mistura de RNase (1 µl) é então adicionada a cada tubo de reação, misturada gentilmente e incubada a 37°C por 30 minutos.

O cDNA de primeira fita gerado pela reação de transcriptase reversa é purificado com o Cartucho Spin de Isolamento de DNA GlassMAX (Gibco-BRL) de acordo com as instruções do fabricante. A cada reação de primeira fita, 120 µl de solução de ligação de NaI 6 M são adicionados. A

solução de cDNA/NaI é então transferida em um cartucho *spin* GlassMAX, e centrifugada por 20 segundos a 13.000 x g. As inserções do cartucho são cuidadosamente removidas, e o fluxo é descartado dos tubos. Os cartuchos *spin* são então colocados de volta nos tubos vazios, e 0,4 ml de tampão de lavagem gelado (4°C) 1x é adicionado a cada cartucho *spin*. Os tubos são centrifugados a 13.000 x g por 20 segundos e o fluxo é descartado. Essa etapa de lavagem é repetida mais três vezes. Os cartuchos GlassMAX são então lavados 4 vezes com 0,4 ml de etanol 70% gelado (4°C). Após o fluxo da lavagem final de etanol 70% ser descartado, os cartuchos são colocados de volta nos tubos e centrifugados a 13.000 x g por mais 1 minuto a fim de secar completamente os cartuchos. As inserções do cartucho *spin* são então transferidas para um tubo de recuperação de amostra fresco, onde 50 µl de ddH₂O tratada com DEPC a 65°C (pré-aquecida) são rapidamente adicionados a cada cartucho *spin*. Os cartuchos são centrifugados a 13.000 x g por 30 segundos para eluir o cDNA.

20 C. *Tailing* de desoxinucleotidil transferase terminal (TdT)

Para cada amostra de cDNA de primeira fita, são adicionados os seguintes componentes a um tubo de PCR de 0,2 ml de paredes finas: 6,5 µl de ddH₂O tratada com DEPC, 5,0 µl de 5x tampão de *tailing*, 2,5 µl de dCTP 2 mM, e 10 µl da amostra de cDNA purificado por GlassMAX apropriado. Cada reação de 24 µl é incubada por 2-3 minutos em um ciclador térmico a 94°C para desnaturar o DNA, e resfriada em gelo úmido por 1 minuto. O conteúdo do tubo é coletado por centrifugação breve. Subseqüentemente, 1 µl de

desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) é adicionado a cada tubo. Os tubos são misturados por pipetagem suave, e incubados por 10 minutos a 37°C em um ciclador térmico PTC-100. Após essa incubação de 10 minutos, o TdT é inativado
5 por aquecimento por ciclagem até 65°C por 10 minutos. As reações são resfriadas em gelo e o cDNA de primeira fita TdT-tailed é armazenado a -20°C.

D. PCR de cDNA de primeira fita dC-tailed

Amplificações por PCR em duplicata (duas reações de
10 PCR independentes para cada amostra de cDNA de primeira fita dC-tailed) são realizadas em um volume de 50 µl contendo 200 µM de dNTPs, 0,4 µM de iniciador de ancoragem abreviado RACE 5' (ID. DE SEQ. N°: 11) e 0,4 µM de Cadeia pesada abrigada GSP2 (ID. DE SEQ. N°: 8) ou Cadeia leve abrigada GSP2 (ID. DE SEQ. N°: 10), Tris-HCl 10 mM (pH
15 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, 5 µl de cDNA dC-tailed e 5 unidades de DNA polimerase Expand™ Hi-Fi (Roche/Boehringer Mannheim GmbH, Alemanha). As reações de PCR são amplificadas com o uso de um protocolo de temperatura de
20 anelamento "Touch-down/Touch-up" em um ciclador térmico programável PTC-100 (MJ Research Inc.) com as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 40 segundos, 5 ciclos a 94°C por 20 segundos, 61°C - 2°C/ciclo por 20 segundos, 72°C por 40 segundos + 1 segundo/ciclo, seguidos
25 por 5 ciclos a 94°C por 25 segundos, 53°C + 1°C/ciclo por 20 segundos, 72°C por 46 segundos + 1 segundo/ciclo, seguidos por 20 ciclos a 94°C por 25 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 51 segundos + 1 segundo/ciclo, e uma incubação final de 72°C por 5 minutos.

30 E. Clonagem de TOPO TA

Os produtos de PCR resultantes são purificados em gel por um gel de agarose 1,0% com o uso do sistema de purificação em gel QIAQuick (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA), clonados por TA em pCR2.1 com a utilização do kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, San Diego, CA, N° de Catálogo K4550-40) e transformados em células TOP1,F' de *E. coli* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Os clones com inserções são identificados por avaliação azul/branco de acordo com as instruções do fabricante, em que os clones brancos são considerados clones positivos. Culturas de 3,5 ml de caldo de líquido de Luria (LB) contendo 50 µg/ml de ampicilina são inoculadas com colônias brancas e desenvolvidas a 37°C de um dia para o outro (cerca de 16 horas) com agitação a 225 rpm.

O Kit "QIAGEN Plasmid Miniprep" (QIAGEN Inc., N° de Catálogo 12125) é usado para purificar DNA de plasmídeo das culturas de acordo com as instruções do fabricante. O DNA de plasmídeo é suspenso em 34 µl de 1x tampão TE (pH 8,0) e a seguir os clones positivos seqüenciados como descrito previamente por seqüenciamento fluorescente de didesoxinucleotídeo e detecção automatizada com o uso de reagentes "ABI Big Dye Terminator 3.1" em diluições 1:4-1:8, e analisado com a utilização de um seqüenciador de DNA ABI 3100. Os iniciadores de seqüenciamento usados incluem os iniciadores T7 (5' GTAATACGACTCACTATAGG 3'; ID. DE SEQ. N°: 12) e M13 reverso (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'; ID. DE SEQ. N°: 13). Os resultados do seqüenciamento confirmarão que os clones correspondem às seqüências de IgG de camundongo.

F. Síntese gênica de novo com o uso de PCR por

extensão de oligonucleotídeos superpostos

Esse método envolve o uso de iniciadores de oligonucleotídeos superpostos e PCR usando DNA polimerase de alta fidelidade ou uma mistura de polimerases para
5 sintetizar uma região V de imunoglobulina ou outro gene. Começando no meio da sequência da região V, são projetados iniciadores de 40-50 bases de tal forma que a cadeia em crescimento seja estendida em 20-30 bases, em qualquer direção, e iniciadores contíguos sobrepostos por um mínimo
10 de 20 bases. Cada etapa de PCR exige dois iniciadores, um que inicia na fita anti-senso (iniciador adiante ou senso) e um que inicia na fita senso (iniciador reverso ou anti-senso) para criar um produto de PCR em crescimento de fita dupla. Durante o projeto do iniciador, podem ser feitas
15 alterações na sequência de nucleotídeos do produto final para criar sítios de enzima de restrição, destruindo sítios de enzima de restrição existentes, adicionar ligantes flexíveis, alterar, eliminar ou inserir bases que alteram a sequência de aminoácidos, otimizar a sequência de DNA
20 global para aumentar a síntese de iniciador e se adaptar às regras de uso de códon para o organismo contemplado para uso na expressão do gene sintético.

Pares de iniciadores são combinados e diluídos de tal forma que o primeiro par esteja a 5 μ M e cada par
25 subsequente possua uma concentração 2 vezes maior até 80 μ M. Um μ l de cada uma dessas misturas de iniciadores é amplificado em uma reação de PCR de 50 μ l usando "Platinum PCR SuperMix-High Fidelity" (Invitrogen, San Diego, CA, N° de Catálogo 12532-016). Após uma desnaturação inicial de 2
30 minutos a 94°C, são realizados 30 ciclos de PCR com o uso

de um perfil de ciclagem de 94°C por 20 segundos, 60°C por 10 segundos; e 68°C por 15 segundos. Os produtos de PCR são purificados com o uso de colunas de purificação por PCR Qiaquick (Qiagen Inc., N° de Catálogo 28704) para remover
 5 iniciadores e enzima em excesso. Esse produto de PCR é então re-amplificado com o conjunto seguinte de pares de iniciadores similarmente diluídos com o uso de condições de PCR exatamente como descritas acima, mas aumentando o tempo de extensão de cada ciclo até 68°C por 30 segundos. O
 10 produto de PCR resultante é novamente purificado por iniciadores e enzimas, como descrito acima, e clonado e seqüenciado por TOPO-TA, exatamente como descrito na seção E acima.

Exemplo 2

15 Construção de pequenos produtos imunofarmacêuticos modulares (SMIPs)

Foi construída uma proteína de ligação multivalente, multiespecífica, com função efetora, que continha um domínio de ligação 1 na forma de um scFv de cadeia simples
 20 recombinante (murídeo/humano) designado 2H7 (V_L-ligante-V_H). O scFv 2H7 é um pequeno produto imunofarmacêutico modular (SMIP) que reconhece especificamente CD20. O domínio de ligação foi baseado em uma seqüência de anticorpo CD20 humano publicamente disponível, Números de
 25 Acesso no GenBank, M17953 para V_H, e M17954 para V_L. SMIPs específicos para CD20 são descritos nas Publicações de Patente U.S. de co-autoria 2003/133939, 2003/0118592 e 2005/0136049, aqui incorporadas em suas totalidades por referência. O ligante peptídico que separa V_L e V_H foi um
 30 ligante de 15 aminoácidos que codifica a seqüência: Asp-

Gly₃Ser-(Gly₄Ser)₂. O domínio de ligação 1 estava localizado no terminal N da proteína de ligação multiespecífica, com o terminal C daquele domínio ligado diretamente ao terminal N de uma sub-região constante contendo uma dobradiça, 5 domínios C_{H2} e C_{H3} (na orientação amino para carbóxi). A sub-região constante era derivada de um anticorpo IgG1, que foi isolado por amplificação por PCR de IgG1 humana de PBMCs humanos. A região de dobradiça foi modificada por substituição de três resíduos Ser no lugar dos três 10 resíduos Cys presentes na versão do tipo selvagem do domínio de dobradiça de IgG1 humana, codificado pela sequência de 15 aminoácidos: EPKSCDKTHTCPPCP (ID. DE SEQ. N°: 14; os três resíduos Cys substituídos por resíduos Ser são indicados em negrito). Em modalidades alternativas, a 15 região de dobradiça foi modificada em uma ou mais das cisteínas, de tal forma que foram geradas dobradiças dos tipos SSS e CSC. Além disso, a prolina final era algumas vezes substituída com uma serina, além das substituições de cisteína.

20 A extremidade do terminal C do domínio C_{H3} foi anexada covalentemente a uma série de domínios de ligantees alternativos justapostos entre o terminal C da sub-região constante e o terminal amino do domínio de ligação 2. Proteínas de ligação multivalentes com função efetora 25 preferidas terão um desses ligantees para afastar a sub-região constante do domínio de ligação 2, embora o ligante não seja um componente essencial das composições de acordo com a invenção, dependendo das propriedades de dobragem de BD2. Para algumas moléculas multivalentes específicas, o 30 ligante pode ser importante para a separação de domínios,

enquanto para outras ele pode ser menos importante. O ligante foi anexado à extremidade do terminal N de scFv 2E12 (V_H -ligante- V_L), que reconhece especificamente CD28. O ligante que separa os domínios V_H e V_L da parte de scFv 2E12 da molécula de ligação multivalente era um ligante de 20 de aminoácidos $(Gly_4Ser)_4$, e não um ligante-padrão $(Gy_4Ser)_3$ normalmente inserido entre os domínios V de um scFv. Verificou-se que o ligante mais longo melhora as propriedades de ligação do scFv 2e12 na orientação V_H - V_L .

10 A molécula de ligação multivalente e multiespecífica construída continha um domínio de ligação 1, que compreende a sequência de peptídeos líder de 2E12 dos aminoácidos 1-23 do ID. DE SEQ. N°: 171; a região variável da cadeia leve 2H7 murídea anti-CD20 humano, que está refletida na posição 15 24 no ID. DE SEQ. N°: 171; um ligante Asp-Gly₃-Ser- $(Gly_4Ser)_2$, que começa no resíduo 130 no ID. DE SEQ. N°: 171, a região variável da cadeia pesada murídea 2H7 anti-CD20 humano com uma substituição de aminoácido de leucina para serina (VHL 11S) no resíduo 11 no domínio variável 20 para V_H , e que possui um único resíduo serina na extremidade da região da cadeia pesada (ou seja, VTVS, em que uma sequência ortodoxa seria VTVSS) (N° de Acesso no Genbank M17953), e interposta entre os dois domínios de ligação BD1 (2H7) e BD2 (2E12) é uma sub-região constante 25 de IgG1 humana, que inclui uma região de dobradiça modificada que compreende uma sequência "CSC" ou uma sequência "SSS", e domínios C_{H2} e C_{H3} do tipo selvagem. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína de ligação multivalente com função efetora são apresentadas 30 nos IDS. DE SEQ. N°s: 228 e 229 para as formas CSC,

respectivamente, e IDS. DE SEQ. N^{os}: 170 e 171 para as formas SSS.

Foram criadas linhagens de células que expressam estavelmente por transfecção através de eletroporação de
5 plasmídeo de expressão recombinante sem cortes ou linearizado, em células de ovário de hamster chinês (células CHO DG44), seguida por seleção em meio contendo metotrexato. As culturas em batelada e os poços principais que produzem o maior nível de proteína de ligação
10 multivalente foram amplificados em níveis crescentes de metotrexato, e as culturas adaptadas foram subsequentelemente clonadas por diluição limitante. As células CHO transfectadas que produzem a proteína de ligação multivalente foram cultivadas em biorreatores ou wave bags
15 com o uso de meio sem soro obtido de JRH Biosciences (Excell 302, N^o de Catálogo 14324) 1.000 M, suplementado com glutamina 4 mM (Invitrogen, 25030-081), piruvato de sódio (Invitrogen 11360-070, diluído até 1X), aminoácidos não essenciais (Invitrogen, 11140-050, diluição final até
20 1X), penicilina-estreptomicina 100 UI/ml (Invitrogen, 15140-122), e insulina recombulin a 1 µg/ml (Invitrogen, 97-503311). Também podem ser usados outros meios basais CHO sem soro para a produção, por exemplo, CD-CHO, e semelhantes.

25 A proteína de fusão foi purificada dos sobrenadantes de cultura de CHO gasto por cromatografia por afinidade com Proteína A. A proteína de ligação multivalente foi purificada com o uso de uma série de etapas de cromatografia e filtração, incluindo um filtro de redução
30 de vírus. Os sobrenadantes da cultura celular foram

filtrados, e depois submetidos à cromatografia por afinidade com Sefarose proteína A sobre uma coluna GE 16/40 Healthcare XK. Após a ligação de proteína à coluna, a coluna foi lavada em dPBS, e depois NaCl 1,0 M, fosfato de sódio 20 mM pH 6,0, e a seguir NaCl 25 mM, NaOAc 25 mM, pH 5,0, para a remoção de proteínas de ligação inespecíficas. A proteína ligada foi eluída da coluna em Glicina 100 mM (Sigma), pH 3,5, e trazida até pH 5,0 com ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico (MES) 0,5 M, pH 6,0. As amostras de proteína foram concentradas até 25 mg/ml em preparação para purificação por GPC. A cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada em um aparelho GE Healthcare AKTA Explorer 100 Air, com o uso de uma coluna GE Healthcare XK e Superdex 200, grau preparativo (GE Healthcare).

O material foi então concentrado e formulado com fosfato de sódio 20 mM e sacarose 240 mM, com um pH resultante de 6,0. A composição foi filtrada antes de ser preenchida em frascos estéreis em várias concentrações, dependendo da quantidade de material recuperada.

Exemplo 3

Construção de cassete de expressão de *scorpion*

Um ácido nucléico contendo o scFv 2H7 sintético (anti-CD20; ID. DE SEQ. N°: 1) ligado a uma sub-região constante como descrito em Exemplo 2 foi designado TRU-015. O ácido nucléico TRU-015, além dos ácidos nucléicos scFv 2E12 sintético (anti-CD28 VL-VH; ID. DE SEQ. N°: 3) e scFv 2E12 sintético (anti-CD28 VH-VL; ID. DE SEQ. N°: 5) que codificam pequenos produtos imunofarmacêuticos modulares, foram usados como modelos para amplificação por PCR dos vários componentes do cassetes de *scorpion*. O modelo, ou

arcabouço (*scaffold*), para o domínio de ligação 1 e para a sub-região constante foi fornecido por TRU-015 (o ácido nucléico que codifica scFv 2H7 (anti-CD20) ligado à sub-região constante), e esse modelo foi construído no vetor de expressão pD18. Os ácidos nucléicos observados acima que
 5 contêm scFv 2E12 em uma entre duas orientações (V_L-V_H e V_H-V_L) forneceram a região codificadora para o domínio de ligação 2.

C_H2C_H3 da dobradiça SSS de TRU-015 para a inserção de
 10 BD2/ligante

Uma versão da IgG1 de scFv 2H7 sintético contendo a dobradiça SSS foi usada para criar um cassete de *scorpion* ao servir como modelo para a adição de um sítio EcoRI para substituir o códon de parada e o sítio XbaI existentes.
 15 Essa molécula foi amplificada por PCR usando o iniciador 9 (ID. DE SEQ. N°: 23; veja a Tabela 1) e o iniciador 87 (ID. DE SEQ. N°: 40; veja a Tabela 1), além da mistura "Platinum PCR High Fidelity" (Invitrogen). O fragmento de 1,5 Kbp resultante foi purificado e clonado no vetor pCR2.1-TOPO
 20 (Invitrogen), transformado em *E. coli* cepa TOP10 (Invitrogen), e a seqüência de DNA verificada.

Tabela 1

	Nº	Nome dos inciadores de PCR	Sequência 5'-3'	ID. DE SEQ. Nº
5	1	hVK3L-F3H3	GCGATAAAGCTTGCCGCCATGGAA GCACCAGCGCAGCTTCTCTTCC	15
	2	hVK3L-F2	ACCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTG CTACTCTGGCTCCCAGATACCACCG	16
	3	hVK3L-F1-2H7VL	GGCTCCCAGATACCACCGGTCAAAT TGTTCCTCTCCAGTCTCCAG	17
	4	2H7VH-NheF	GCGATAGCTAGCCAGGCTTATCTAC AGCAGTCTGG	18
	5	G4S-NheR	GCGATAGCTAGCCCCACCTCCTCCA GATCCACCACCGCCCGAG	19
10	6	015VH-XhoR	GCGTACTCGAGGAGACGGTGACCGT GGTCCCTGTG	20
	7	G1H-C-XHO	GCAGTCTCGAGCGAGCCCAAATCTTG TGACAAAATC	21
	8	G1H-S-XHO	GCAGTCTCGAGCGAGCCCAAATCTTC TGACAAAATC	22
	9	CH3R-EcoR1	GCGTGAGAATTCTTACCCGGAGACAGG GAGAGGCTC	23
	10	G1-XBA-R	GCGACGTCTAGAGTCATTTACCCGGAG ACAGG	24
15	11	G4SLinkR1-S	AATTATGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGT GGTGGATCTGGAGGAGGTGGGAGTGGG	25
	12	G4SLinkR1-AS	AATTCCTACTCCACCTCCTCCAGATCCA CCACCGCCCGAGCCACCGCCACCAT	26
	13	2E12VLXbaR	GCGTGTCTAGATTAACGTTTGATTCCAG CTTGGTG	27
	14	2E12VLR1F	GCGATGAATTCTGACATTGTGCTCACCCA ATCTCC	28
	15	2E12VHR1F	GCGATGAATTCTCAGGTGCAGCTGAAGGA GTCAG	29
20	16	2E12VHXbaR	GCGAGTCTAGATTAAGAGGAGACGGTGAC TGAGGTTC	30
	17	2e12VHdXbaF1	GGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATG	31
	18	2e12VHdXbaR1	ATTCCCAGCCACTCCAGACCCTTTCCTG	32
	19	IgBsrG1F	GAGAACCACAGGTGTACACCCTG	33
	20	IgBsrG1R	GCAGGGTGTACACCTGTGGTTCTCG	34

Iniciadores de sequenciamento			
5	82	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC 35
	83	M13F	GTAACACGACGGCCAGTG 36
	84	T7	GTAATACGACTCACTATAGG 37
	85	pD18F-17	AACTAGAGAACCCACTG 38
	86	pD18F-20	GCTAACTAGAGAACCCACTG 39
	87	pD18F-1	ATACGACTCACTATAGGG 40
	88	pD18R-s	GCTCTAGCATTTAGGTGAC 41
	89	CH3seqF1	CATGAGGCTCTGCACAAC 42
	90	CH3seqF2	CCTCTACAGCAAGCTCAC 43
	91	CH3seqR1	GGTTCTTGGTCAGCTCATC 44
	92	CH3seqR2	GTGAGCTTGCTGTAGAGG 45

10 **Tabela 1.** Iniciadores de oligonucleotídeos usados para
 construir cassete de *scorpion* CD20-CD28. Os iniciadores são
 separados em 2 grupos, de PCR e Sequenciamento. Os
 iniciadores de PCR foram usados para construir o cassete, e
 os iniciadores de sequenciamento foram usados para
 15 confirmar a sequência de DNA de todos os intermediários e
 das construções finais.

Fusão de n2H7 V_K e da sequência líder V_{K3} humana

A mutagênese por PCR dirigida por oligonucleotídeo foi
 usada para introduzir um sítio de restrição AgeI (ACCGGT)
 20 na extremidade 5' da região codificadora para TRU-015 VK, e
 um sítio de restrição Nhe I (GCTAGC) na extremidade 3' da
 região codificadora para o ligante (G4S)₃ usando os
 iniciadores 3 e 5 da Tabela 1. Como o iniciador 3 também
 codifica os últimos 6 aminoácidos do líder de VK3 humana
 25 (gb:X01668), foi usada PCR por superposição para adicionar
 sequencialmente as sequências do terminal N do líder,
 incluindo uma box de Kozak de consenso e sítio de restrição
 HindIII (AAGCTT) usando os iniciadores 1, 2 e 5 da Tabela
 1.

30 **Construção de dobradiça-C_{H2}C_{H3} SSS de IgG1 n2H7**

Os iniciadores 4 e 6 (IDS. DE SEQ. N^{os}: 18 e 20, respectivamente; Tabela 1) foram usados para re-amplificar a V_H de TRU-015 com um sítio NheI 5' para fundir com a V_K para TRU-015 e um sítio Xho I (5'-CTCGAG-3') na junção da
 5 extremidade 3' com os domínios da C_{H2}C_{H3} de dobradiça de IgG1. Da mesma forma, a região C_{H2}-C_{H3} da dobradiça de IgG1 foi amplificada com o uso dos iniciadores 8 e 9 da Tabela 1, introduzindo um sítio Xho I 5' e substituindo a
 10 extremidade 3' existente com um sítio EcoRI (5'-GAATTC-3') para clonagem, e destruindo o códon de parada para permitir a tradução do Domínio de Ligação 2 anexado abaixo do domínio C_{H3}. Essa versão do cassete de *scorpion* se distingue do cassete descrito previamente pelo prefixo "n".

Além da proteína de ligação multivalente descrita
 15 acima, uma Proteína, de acordo com a invenção pode ter um domínio de ligação, o domínio de ligação 1 ou 2, ou ambos, que corresponde a uma única região variável de uma imunoglobulina. Modalidades exemplares desse aspecto da invenção incluiriam domínios de ligação que correspondem ao
 20 domínio V_H de um anticorpo camelídeo, ou uma V única modificada ou não modificada de um anticorpo de outra espécie capaz de se ligar ao antígeno-alvo, embora qualquer domínio variável único seja contemplado como útil nas proteínas da invenção.

25 Construções de VL-VH e VH-VL de 2E12

A fim de tornar os scFvs 2E12 compatíveis com o cassete, um sítio Xba I (5'-TCTAGA-3') interno teve que ser destruído usando os iniciadores de oligonucleotídeos superpostos 17 e 18 da Tabela 1. Esses dois iniciadores em
 30 combinação com pares de iniciadores 14/16 (V_L-V_H) ou 13/15

(V_H-V_L) foram usados para amplificar os dois domínios de ligação orientados opostamente, de tal forma que ambos tivessem sítios EcoRI e XbaI nas suas extremidades 5' e 3', respectivamente. Os iniciadores 13 e 16 também codificam um
 5 códon de parada (TAA) imediatamente em frente ao sítio Xba I.

Construção LH/HL 2e12 de IgG1 2H7 SSS

Adição do ligante de Domínio efetor-Domínio de Ligação 2 (ligantees STD - STD1 e STD2)

10 Os iniciadores complementares 11 e 12 da Tabela 1 foram combinados, aquecidos até 70°C e resfriados lentamente até a temperatura ambiente para permitir o anelamento das duas fitas. Grupos fosfato 5' foram adicionados com o uso de polinucleotídeo T4 quinase (Roche)
 15 em tampão de ligação 1X com ATP 1 mM (Roche) usando o protocolo do fabricante. O ligante de fita dupla resultante foi então ligado no sítio EcoRI entre as regiões codificadoras para o terminal C_{H3} de IgG1 e o começo do Domínio de Ligação 2 com o uso de DNA T4 ligase (Roche). As
 20 construções de DNA resultantes foram rastreadas quanto à presença de um sítio EcoRI na junção ligante-BD2 e a sequência de nucleotídeos GAATTA na junção C_{H3}-ligante. A construção correta do ligante STD1 foi então re-digerida com EcoRI, e a ligação do ligante repetida para produzir
 25 uma molécula que tinha um ligante composto por duas repetições idênticas (STD 2) da sequência Lx 1. As construções de DNA foram novamente rastreadas como acima.

Exemplo 4

Estudos de expressão

30 Foram feitos estudos de expressão nos ácidos nucléicos

descritos acima que codificam proteínas de ligação multivalentes com função efetora. Os ácidos nucleicos que codificam proteínas de ligação multivalentes foram transfectados transitoriamente em células COS e as células

5 transfectadas foram mantidas sob condições bem conhecidas que permitem a expressão gênica heteróloga nessas células. O DNA foi transfectado transitoriamente em células COS com o uso de PEI ou DEAE-Dextrana, como descrito previamente (PEI = Boussif O. e cols., *PNAS* 92: 7.297-7.301, (1995),

10 aqui incorporado por referência; Pollard H. e cols., *JBC* 273: 7.507-7.511, (1998), aqui incorporado por referência). Foram feitas várias transfecções independentes de cada nova molécula a fim de determinar o nível de expressão médio para cada nova forma. Para transfecção por PEI, as células

15 COS foram plaqueadas sobre placas de cultura de tecido de 60 mm em meio DMEM/FBS 10%, e incubadas de um dia para o outro, de forma que fossem aproximadamente 90% confluentes no dia da transfecção. O meio foi mudado para DMEM sem soro sem antibióticos, e incubado por 4 horas. O meio de

20 transfecção (4 ml/placa) continha DMEM sem soro com 50 µg de PEI e 10-20 µg do DNA plasmídeo de interesse. O meio de transfecção foi misturado por turbilhonamento, incubado em temperatura ambiente por 15 minutos, e adicionado às placas após aspiração do meio existente. As culturas foram

25 incubadas por 3-7 dias, antes da coleta de sobrenadantes. Os sobrenadantes da cultura foram testados quanto à expressão de proteína por SDS-PAGE, *Western blotting*, a ligação verificada por citometria de fluxo e a função testada com o uso de diversos ensaios, incluindo ADCC, CDC,

30 e experimentos de co-cultura.

Análise SDS-PAGE e análise *Western blotting*

Foram preparadas amostras de sobrenadantes de cultura brutos (normalmente 30 µl/poço) ou alíquotas de proteína purificada, contendo 8 µg de proteína por poço, e 2X tampão

5 Tris-Glicina SDS (Invitrogen) foi adicionado até uma concentração final 1x. Dez (10) µl de Marcador SeeBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram processados para fornecer padrões de tamanho de peso molecular (PM). As variantes das

10 proteínas de ligação multivalentes (de fusão) foram submetidas à análise SDS-PAGE em géis Novex Tris-glicina 4-20% (Invitrogen, San Diego, CA). As amostras foram carregadas usando tampão de amostra Novex Tris-glicina SDS (2X) sob condições redutoras ou não redutoras após aquecimento a 95°C por 3 minutos, seguido por eletroforese

15 a 175 V por 60 minutos. A eletroforese foi realizada com o uso de tampão de processamento 1X Novex Tris-Glicina SDS (Invitrogen).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF com o uso de um aparelho

20 eletroblotter semi-seco (Ellard, Seattle, WA) por 1 hora a 100 mAmp. Os tampões de transferência para *Western* incluíam os seguintes três tampões presentes em papel de filtro Whatman saturado, e empilhados em sucessão: N° 1 contém 36,34 g/litro de Tris, pH 10,4, e metanol 20%; N° 2 contém

25 3,02 g/litro de Tris, pH 10,4, e metanol 20%; e N° 3 contém 3,03 g/litro de Tris, pH 9,4, 5,25 g/litro de ácido 8-amino caprótico, e metanol 20%. As membranas foram bloqueadas em BLOTTO = leite desnatado 5% em PBS de um dia para o outro com agitação. As membranas foram incubadas com anti-IgG

30 humana de cabra conjugada a HRP (específica para Fc,

Caltag) a 5 µg/ml em BLOTTO por uma hora, e depois lavadas 3 vezes por 15 minutos cada em PBS-Tween 20 0,5%. As membranas úmidas foram incubadas com solução ECL por 1 minuto, seguida por exposição à película X-omat por 20 segundos. A Figura 2 mostra um *Western Blot* de proteínas expressas no sobrenadante de cultura de célula COS (30 µl/poço) submetidas à eletroforese sob condições não redutoras. As raias são indicadas com marcadores 1-9 e contêm as seguintes amostras: Raia 1 (valor de corte = Marcadores SeeBlue, kDa são indicados ao lado do blot. Raia 2= 2H7-sssIgG P2385/P3315-STD1-2e12 V_LV_H; Raia 3= 2H7-sssIgG P2385/P3315-STD1-2e12 V_HV_L; Raia 4 = 2H7-sssIgG P2385/P331S-STD2-2e12 V_LV_H; Raia 5 = 2H7-sssIgG P2385/P331S-STD2-2e12 V_HV_L; Raia 6 = 2e12 V_LV_H SMIP; Raia 7 = 2e12 V_HV_L SMIP; Raia 8 = 2H7 SMIP. 2H7 nessas construções está sempre na orientação V_L-V_H, sssIgG indica a identidade da dobradiça/ligante localizada na posição do ligante 1, como mostrado na Figura 5, P238S/P331S indica a versão de IgG1 humana com mutações do tipo selvagem (primeiro aa listado) para mutante (segundo aa listado) e a posição de aminoácido na qual ocorrem nos domínios C_{H2} e C_{H3} de IgG1 humana do tipo selvagem, STD1 indica o ligante de 20 aminoácidos (18 + sítio de restrição) localizado na posição do ligante 2, como mostrado na Figura 5, e STD2 indica o ligante 38 de aminoácidos (36 + sítio de restrição) localizado na posição do ligante 2, como mostrado na Figura 6.

Estudos de ligação

Foram feitos estudos de ligação para avaliar as propriedades de ligação biespecíficas dos peptídeos de

ligação multivalentes e multiespecíficos CD20/CD28. Inicialmente, foram adicionadas células WIL2-S às placas de 96 poços, e centrifugadas até peletizar as células. Às placas semeadas, foi adicionada proteína CD20/CD28
5 purificada, usando titulações de duas vezes através da placa a partir de 20 µg/ml reduzindo até 0,16 µg/ml. Uma série de diluições de duas vezes de proteína purificada TRU-015 (fonte do domínio de ligação 1) também foi adicionada aos poços da placa semeada, com a concentração
10 de TRU-015 variando de 20 µg/ml a 0,16 µg/ml. Um poço sem proteína serviu como controle do nível de fundo.

As placas semeadas contendo as proteínas foram incubadas no gelo por uma hora. Subseqüentemente, os poços foram lavados uma vez com 200 µl de FBS 1% em PBS.
15 Anticorpo anti-humano de cabra marcado com FITC (específico para Fc) a 1:100 foi então adicionado a cada poço, e as placas foram novamente incubadas no gelo por uma hora. As placas foram então lavadas uma vez com 200 µl de FBS 1% em PBS, e as células foram ressuspensas em 200 µl de FBS 1% e
20 analisadas por FACS.

Para avaliar as propriedades de ligação do peptídeo anti-CD28 2E12 V_HV_L, células CHO que expressam CD28 foram plaqueadas por semeadura em poços individuais de uma placa de cultura. A proteína CD20/CD28 purificada foi então
25 adicionada aos poços individuais com o uso de um esquema de diluição de duas vezes, que se estende de 20 µg/ml reduzindo até 0,16 µg/ml. A proteína purificada 2E12IgG-V_HV_L SMIP foi adicionada aos poços semeados individuais, novamente com o uso de um esquema de diluição de duas
30 vezes, ou seja, de 20 µg/ml até 0,16 µg/ml. Um poço não

recebeu proteína para fornecer um controle do nível de fundo. As placas foram então incubadas no gelo por uma hora, lavadas uma vez com 200 µl de FBS 1% em PBS, e anticorpo anti-humano de cabra marcado com FITC (específico para Fc, CalTag, Burlingame, CA) a 1:100 foi adicionado a cada poço. As placas foram novamente incubadas no gelo por uma hora e subseqüentemente lavadas uma vez com 200 µl de FBS 1% em PBS. Após a ressuspensão das células em 200 µl de FBS 1%, a análise FACS foi realizada. Os resultados mostraram que as proteínas de ligação multivalentes com o domínio de ligação 1 no terminal N de CD20 se ligaram ao CD20; aquelas proteínas que possuem o domínio de ligação 2 do terminal C de CD28 na orientação N-V_H-V_L-C também se ligaram ao CD28.

Foi demonstrado que as proteínas expressas se ligam ao CD20 apresentado em células WIL-2S (veja Figura 3) e ao CD28 apresentado em células CHO (veja a Figura 3) por citometria de fluxo (FACS), demonstrando, dessa forma, que BD1 ou BD2 poderia funcionar para se ligar ao antígeno-alvo específico. Cada conjunto de dados nos gráficos na Figura 3 mostra a ligação de diluições seriais das diferentes proteínas de ligação multivalentes (de fusão) sobre as faixas de titulação indicadas. Os dados obtidos com a utilização dessas construções iniciais indicam que as proteínas de ligação multivalentes (de fusão) com a versão 2 do domínio de ligação usando 2e12 na orientação V_HV_L expressam melhor e se ligam melhor ao CD28 do que a forma na orientação V_L-V_H em concentrações equivalentes.

A Figura 4 mostra uma apresentação gráfica dos resultados de estudos de ligação realizados com proteínas

purificadas de cada uma dessas transfecções/construções. A figura mostra os perfis de ligação das proteínas às células WIL-2S que expressam CD20, demonstrando que a molécula multivalente se liga ao CD20 tão bem quanto o SMIP de especificidade única na mesma concentração. Os painéis superior e inferior da Figura 5 mostram os perfis de ligação da especificidade BD2 (2e12=CD28) às células CHO CD28. Para ligação de domínio de ligação 2 ao CD28, a orientação das regiões V afetou a ligação do 2e12. As proteínas de ligação multivalentes 2H7-sss-hIgG-STD1-2e12 com o 2e12 na orientação V_H-V_L (HL) apresentaram ligação em um nível equivalente ao SMIP de especificidade única, enquanto a molécula 2e12 LH mostrou uma ligação menos eficiente na mesma concentração.

Exemplo 5

Construção de várias formas de ligante das proteínas de fusão multivalentes

Este exemplo descreve a construção das diferentes formas do ligante listadas na tabela mostrada na Figura 6.

Construção de ligantees C_{H3} -BD2 H1 a H7

Para explorar o efeito do comprimento e da composição do ligante C_{H3} -BD2 sobre a expressão e ligação das moléculas *scorpion*, foi projetado um experimento para comparar a molécula 2H7sssIgG1-Lx1-2e12HL existente com um conjunto maior de construções similares com diferentes ligantees. Usando 2H7sssIgG1-Lx1-2e12HL como modelo, foi feita uma série de reações de PCR utilizando os iniciadores listados na Tabela de oligonucleotídeos 2, o que criou ligantees que tinham comprimento variando de 0 de 16 aminoácidos. Esses ligantees foram construídos como

fragmentos de ácido nucléico que transpunham a região codificadora para C_{H3} no sítio BsrGI até o final do ácido nucléico que codifica a junção ligante-BD2 no sítio EcoRI.

Tabela 2

5				
	Nº	Nome dos iniciadores de PCR	Sequência 5'-3'	ID. DE SEQ. Nº
	1	L1-11R	GCGATAGAATTCCCAGATCCACCACCGCCCGA GCCACCGCCACCATAATTC	46
	2	L1-6R	GCGATAGAATTCCCAGAGCCACCGCCACCATA ATTC	47
10	3	L3R	GCGTATGAATTCCCCGAGCCACCGCCACCCTTA CCCGGAGACAGG	48
	4	L4R	GCGTATGAATTCCCAGATCCACCACCGCCCGAG CCACCGCCACCCTTAC	49
	5	L5R	GCGTATGAATTCCCGCTGCCTCCTCCCCAGATC CACCACCGCC	50
	6	IgBsrG1F	GAGAACCACAGGTGTACACCCTG GCGATAGAATTCCGACAAGGTGGACACCCCTTAC	51
	7	L-CPPCPR	CCGGAGACAGGGAGAG	52

15

Tabela 2. Sequências de iniciadores usados para gerar variantes do ligante CH3-BD2.

A Figura 6 mostra a estrutura esquemática de uma proteína de fusão multivalente (de fusão) e mostra a orientação das regiões V para cada domínio de ligação, a sequência presente na posição do ligante 1 (são listados somente os resíduos Cys) e a sequência (e identificador) para o(s) ligante(s) localizada na posição do ligante 2 das moléculas.

25

Exemplo 6

Estudos de ligação e funcionais com formas variantes do ligante dos protótipos de proteínas de fusão multivalentes

2H7-IgG-2e12

Este exemplo mostra os resultados de uma série de estudos de expressão e de ligação no "protótipo" de

30

construção 2H7-sssIgG-Hx-2e12 V_HV_L com vários ligantees (H1- H7) presentes na posição do ligante 2. Cada uma dessas proteínas foi expressa por transfecção transitória em larga escala de COS e purificação das moléculas com o uso de cromatografia por afinidade com proteína A, como descrito nos exemplos anteriores. As proteínas purificadas foram então submetidas às análises que incluem SDS-PAGE, *Western blotting*, estudos de ligação analisados por citometria de fluxo, e ensaios funcionais quanto à atividade biológica.

10 **Estudos de ligação que comparam as diferentes orientações de BD2**

Foram feitos estudos de ligação como descrito nos exemplos anteriores, exceto que foi usado material purificado por proteína A, e uma quantidade constante de proteína de ligação (de fusão) foi usada para cada variante estudada, ou seja, 0,72 µg/ml. A Figura 7 mostra um gráfico de colunas que compara as propriedades de ligação de cada variante do ligante e variante de orientação de 2e12 para células-alvo CD20 e CD28. H1-H6 referem-se às construções com os ligantees H1-H6 e 2e12 na orientação V_H-V_L . L1-L6 referem-se às construções com os ligantees H1-H6 e 2e12 na orientação V_L-V_H . Os dados demonstram que a especificidade do domínio de ligação 2 para 2e12 se liga bem mais eficazmente quando presente na orientação HL (amostras H1-H6) do que quando na orientação LH (amostras L1-L6). O efeito do comprimento do ligante é complicado pela descoberta, com mostrado no conjunto seguinte de figuras, de que moléculas com os ligantees mais longos contêm algumas moléculas clivadas de especificidade única que não possuem a especificidade de ligação de CD28 no terminal

carbóxi. Foram feitos outros experimentos que visavam a ligação de ligantes selecionados, com os resultados mostrados nas Figuras 10, 12 e 13.

Análise SDS-PAGE de variantes purificadas do ligante

5 H1-H7

Foram preparadas amostras de alíquotas de proteína purificada, contendo 8 µg de proteína por poço, e tampão 2X Tris-Glicina SDS (Invitrogen) foi adicionado até uma concentração final de 1x. Para amostras/géis reduzidos, 10X
 10 tampão de redução foi adicionado até 1x às amostras, mais tampão Tris-Glicina SDS. Dez (10) µl de Marcador SeeBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram processados para gerar padrões de peso molecular. As variantes das proteínas de ligação multivalentes (de fusão) foram submetidas a
 15 análises SDS-PAGE em géis de Novex Tris-glicina 4-20% (Invitrogen, San Diego, CA). As amostras foram carregadas com o uso de tampão de amostra Novex Tris-glicina SDS (2X) sob condições redutoras ou não redutoras após aquecimento a 95°C por 3 minutos, seguido por eletroforese a 175 V por 60
 20 minutos. A eletroforese foi realizada com o uso de tampão de processamento 1X Novex Tris-Glicina SDS (Invitrogen). Os géis foram corados após eletroforese em corante Coomassie SDS PAGE R-250 por 30 minutos com agitação, e descorados por pelo menos uma hora. A Figura 8 mostra os géis corados
 25 com Coomassie não reduzidos e reduzidos das variantes das proteínas de ligação multivalentes (de fusão) [2H7-sss-hIgG P238S/P331S-Hx-2e12 V_HV_L], juntamente com TRU-015 e 2e12 HLSPMP como amostras de controle. À medida que o comprimento do ligante é aumentado, a quantidade de
 30 proteína processada no tamanho aproximado do SPMP (ou 52

kDa) aumenta. O aumento da quantidade de proteína nessa banda corresponde a uma diminuição na quantidade de proteína na banda superior processada em torno de 90 kDa. Os dados do gel indicam que a molécula de comprimento total
 5 está sendo clivada no ligante ou próximo a ele, para gerar uma molécula que não possui a região BD2. Um fragmento de BD2 menor não está presente, indicando (1) que a sequência de nucleotídeos dentro da sequência ligantea pode estar criando um sítio de *splice* oculto que remove o fragmento
 10 menor do transcrito de RNA unido, ou (2) que a proteína é clivada proteoliticamente após tradução do polipeptídeo de tamanho integral, e que o fragmento de BD2 menor é instável, ou seja, suscetível ao processamento proteolítico. O *Western blotting* de algumas dessas
 15 moléculas indica que todas as proteínas contêm a sequência de CD20 BD1, mas a banda menor não possui a reatividade de CD28 BD2. Não foi observada nenhuma banda menor que migra no tamanho de scFv "desnudo" (25-27 kDa) em qualquer um dos géis ou *blots*, o que indica que esse fragmento peptídico
 20 menor não está presente nas amostras.

Ligação por *Western Blot* de BD1 e BD2 por Fab específico para 2H7 ou CD28mIg

A Figura 9 mostra os resultados de *Western blotting* das proteínas de ligação multivalentes (de fusão) 2H7-sss-
 25 hIgG-H6 comparados com cada SMIP de especificidade única.

A eletroforese foi realizada sob condições não redutoras, e sem fervura das amostras antes da carga. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF usando um aparelho eletroblotter semi-
 30 seco (Ellard, Seattle, WA) por 1 hora a 100 mAmp. As

membranas foram bloqueadas em BLOTTO (leite desnatado 5% em PBS) de um dia para o outro com agitação. Figura 9A: as membranas foram incubadas com o AbyD02429.2, um Fab dirigido ao anticorpo de 2H7, a 5 µg/ml em BLOTTO por uma
 5 hora, e depois lavadas 3 vezes por 5 minutos cada em PBS-Tween 20 0,5%. As membranas foram então incubadas em 6X His-HRP por uma hora em uma concentração de 0,5 µg/ml. Os blots foram lavados três vezes por 15 minutos cada em PB
 ST. As membranas úmidas foram incubadas com solução ECL por
 10 1 minuto, seguida por exposição à película X-omat por 20 segundos.

Figura 9B: as membranas foram incubadas com CD28Ig (Ancell, Bayport, MN) a 10 µg/ml em BLOTTO, e depois lavadas três vezes por 15 minutos cada em PBS-Tween 20
 15 0,5%. As membranas foram então incubadas em anticorpo anticomundongo de cabra conjugado à HRP (CalTag, Burlingame, CA) a 1:3.000 em BLOTTO. As membranas foram lavadas três vezes, por 15 minutos cada, e depois incubadas em solução ECL por 1 minuto, seguido por exposição à
 20 película X-omat por 20 segundos. Os resultados dos Western blots indicaram que o domínio de ligação de CD28 estava presente na fração de "monômero" multivalente que migra em aproximadamente 90 kDa, e em formas de ordem superior. Não havia bandas detectáveis que migrassem na posição esperada
 25 para um fragmento de tamanho de SMIP único ou de scFv desnudo. Quando o Fab anti-idiótipo de CD20 foi usado, foi detectado um fragmento com tamanho de SMIP, indicando a presença de um fragmento peptídico contendo (2H7-sss-hIgG), e sem a porção CD28 scFy BD2 da proteína de fusão.

30 Estudos de ligação em ligantees selecionados

A Figura 10 mostra os resultados de estudos de ligação realizados nas proteínas de fusão purificadas 2H7-sss-hIgG-Hx-2e12. Foram feitos estudos de ligação para avaliar as propriedades de ligação biespecíficas dos peptídeos de
5 ligação multiespecíficos CD20/CD28. Inicialmente, células WIL2-S foram plaqueadas com a utilização de técnicas convencionais. Às placas semeadas, foi adicionada proteína CD20/CD28 purificada, com o uso de titulações de duas vezes ao longo da placa a partir de 20 µg/ml até 0,16 µg/ml. Uma
10 série de diluições de duas vezes de proteína TRU-015 (fonte do domínio de ligação 1) purificada também foi adicionada aos poços da placa semeada, com a concentração de TRU-015 se estendendo de 20 µg/ml até 0,16 µg/ml. Um poço sem proteína serviu como controle do nível de fundo.

15 As placas semeadas contendo as proteínas foram incubadas no gelo por uma hora. Subseqüentemente, os poços foram lavados uma vez com 200 µl de FBS 1% em PBS. Anticorpo anti-humano de cabra marcado com FITC (específico para Fc) a 1:100 foi então adicionado a cada poço, e as
20 placas foram novamente incubadas no gelo por uma hora. As placas foram então lavadas uma vez com 200 µl de FBS 1% em PBS e as células foram ressuspensas em 200 µl de FBS 1% e analisadas por FACS.

Para avaliar as propriedades de ligação do peptídeo
25 2E12 V_HV_L anti-CD28, células CHO que expressam CD28 foram plaqueadas por semeadura em poços individuais de uma placa de cultura. A proteína CD20/CD28 purificada foi então adicionada aos poços individuais com o uso de um esquema de diluição de duas vezes, estendendo-se de 20 µg/ml até 0,16
30 µg/ml. A proteína SMIP 2E12IgGvHvL purificada foi

adicionada aos poços semeados individuais, novamente com o uso de um esquema de diluição de duas vezes, ou seja, de 20 µg/ml até 0,16 µg/ml. Um poço não recebeu proteína para fornecer um controle do nível de fundo. As placas foram
5 então incubadas no gelo por uma hora, lavadas uma vez com 200 µl de FBS 1% em PBS, e anticorpo anti-humano de cabra marcado com FITC (Fc Sp) a 1:100 foi adicionado a cada poço. As placas foram novamente incubadas no gelo por uma hora e subsequentemente lavadas uma vez com 200 µl de FBS
10 1% em PBS. Após ressuspensão das células em 200 µl de FBS 1%, a análise FACS foi realizada. Foi demonstrado que as proteínas expressas se ligam ao CD20 apresentado em células WIL-2S (veja Figura 10A) e ao CD28 apresentado em células CHO (veja a Figura 10B) por citometria de fluxo (FACS),
15 demonstrando, dessa forma, que BD1 ou BD2 poderia funcionar para se ligar ao antígeno-alvo específico. Além disso, foi demonstrado que o ligante usado (H1-H6) não afeta significativamente a avidéz de ligação ao antígeno-alvo.

Fracionamento por SEC de proteínas de ligação
20 *multivalentes (de fusão)*. A proteína de ligação (de fusão) foi purificada dos sobrenadantes de células de cultura por cromatografia por afinidade com Sefarose proteína A sobre uma coluna GE Healthcare XK 16/40. Após ligação de proteína à coluna, a coluna foi lavada em dPBS, e depois NaCl 1,0 M,
25 fosfato de sódio 20 mM pH 6,0, e a seguir NaCl 25 mM, NaOAc 25 mM, pH 5,0, para a remoção de proteínas de ligação inespecíficas. A proteína ligada foi eluída da coluna em Glicina 100 mM (Sigma), pH 3,5, e trazida até o pH 5,0 com ácido 2-(N-Morfolino) etanossulfônico (MES) 0,5 M, pH 6,0.
30 As amostras de proteína foram concentradas até 25 mg/ml com

a utilização de técnicas convencionais em preparação para a purificação por GPC. A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi realizada em um aparelho GE Healthcare AKTA Explorer 100 Air, usando uma coluna GE Healthcare XK e
5 Superdex 200, grau preparativo (GE Healthcare).

A Figura 12 mostra uma tabela que resume os resultados do fracionamento por SEC das diferentes proteínas de ligação (de fusão). Com o aumento do comprimento do ligante, a complexidade das moléculas em solução também
10 aumenta, o que torna difícil isolar o pico de interesse, ou POI, de formas de ordem superior por HPLC. O ligante H7 parece resolver muito dessa complexidade de uma forma mais homogênea em solução, de tal forma que as formas solúveis migram principalmente como um POI único em aproximadamente
15 172 kDa.

Estudos de ligação adicionais

Foi realizada uma segunda série de experimentos (veja Figuras 12 e 13) com um subconjunto menor de proteínas de ligação multivalentes (de fusão), dessa vez comparando os
20 ligantes H3, H6 e H7. Os dados demonstram que o nível de ligação cai mais significativamente para a ligação ao CD28 do que para a ligação ao CD20, mas ambos caem ligeiramente à medida que o comprimento do ligante aumenta. Além disso, os dados mostraram que o ligante H7 exibiu o maior nível de
25 ligação a ambos os antígenos. Esses dados foram obtidos com a utilização de proteínas de ligação multivalentes (de fusão) purificadas com proteína A, mas não foram purificadas adicionalmente por SEC e, portanto, várias formas das moléculas podem ser observadas presentes em
30 solução. Os resultados também indicaram que a forma

truncada pode ter sido menos estável do que o verdadeiro polipeptídeo multivalente, na medida em que as curvas de ligação não parecem refletir plenamente a quantidade significativa da forma de especificidade única presente em
5 solução para o ligante H6.

Demonstração de ligação multiespecífica por uma única molécula

Foi realizado um ensaio de ligação alternativo (veja Figura 13), no qual a ligação ao CD20 na superfície de
10 células WIL-2S foi detectada com um reagente específico para o CD28 BD2, demonstrando, dessa forma, que a ligação simultânea pode ocorrer para ambos os antígenos-alvos, envolvendo tanto BD1 quanto BD2 na mesma proteína de ligação multiespecífica (de fusão) (veja a Figura 12). Esse
15 ensaio demonstra a propriedade de ligação multiespecífica das proteínas.

Exemplo 7

Construção de proteínas de ligação multiespecífica (de fusão) com especificidades alternativas em BD2

20 Além do protótipo da molécula de ligação multiespecífica CD20-CD28, foram feitas duas outras formas com regiões alternativas do domínio de ligação 2, incluindo domínios de ligação de CD37 e CD3. Também foram feitas moléculas com vários dos domínios de ligantes descritos
25 para as proteínas de ligação (de fusão) multiespecíficas [HL de 2H7-sss-IgG-Hx/STDx-2e12]. A construção dessas moléculas de ligação multiespecífica (de fusão) adicionais é descrita abaixo.

Construção do domínio de ligação anti-CD37

N°	Nome	Sequência	ID. DE SEQ. N°
23	G281LH-NheR	ACTGCTGCAGCTGGACCGCGCT AGCTCCGCCGCCACCCGAC	53
24	G281LH-NheF	GGCGGAGCTAGCGCGGTCCAGC TGCAGCAGTCTGGACCTG	54
5 25	G281-LH-LPinF	GCGATCACCGGTGACATCCAGAT GACTCAGTCTCCAG	55
26	G281-LH-HXhoR	GCGATACTCGAGGAGACGGTGAC TGAGGTTCTTGAC	56
27	G281-LH-LEcoF	GCGATCGAATTCAGACATCCAGAT GACTCAGTCTCCAG	57
28	G281-LH-HXbaR	GCGATTCTAGATTAGGAAGAGACG GTGACTGAGGTTCTTGAC	58
29	G281-HL-HF	GCGATAACCGGTGCGGTCCAGCTG CAGCAGTCTGGAC	59
10 30	G281-HL-HR3	GACCCACCACCGCCCGAGCCACCG CCACCAGAAGAGACGGTGACTGAGG	60
31	G281-HL-HR2	TTC ACTCCCGCCTCCTCCTGATCCGCCG CCACCCGACCCACCCGCCCGAG	61
32	G281-HL-HNheR	GAGTCATCTGGATGTCGCTAGCACTC CCGCCTCCTCCTGATC	62
33	G281-HL-LNheF	ATCAGGAGGAGGCGGGAGTGCTAGC GACATCCAGATGACTCAGTC	63
15 34	G281-HL-LXhoR	GCGATACTCGAGCCTTTGATCTCCAG TTCGGTGCCTC	64
35	G281-HL-LXbaR	GCGATATCTAGACTCAACCTTTGATCT CCAGTTCGGTGCCTC	65
36	G281-HL-EcoF	GCGATAGAATTCGCGGTCCAGCTGCA GCAGTCTGGAC	66

Tabela 3. Iniciadores de oligonucleotídeos usados para gerar domínios de ligação G28-1 anti-CD37 tanto para moléculas de SMIP quanto para *scorpions*.

O G28-1 scFv (ID. DE SEQ. N°:102) foi convertido no SMIP G28-1 LH por PCR com a utilização dos iniciadores na Tabela 3 acima. Com a combinação dos iniciadores 23 e 25 com 10 ng de G28-1 scFv, a VK foi amplificada por 30 ciclos de 94°C, 20 segundos, 58°C, 15 segundos, 68°C, 15 segundos usando a mistura de PCR Platinum PCR Supermix Hi-Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) em um ciclador térmico ABI 9700. O produto dessa PCR tinha os sítios de restrição PinAI (AgeI) na extremidade 5' da VK e NheI na extremidade do

ligante scFv (G4S)₃. A V_H foi alterada de forma similar por combinação dos iniciadores 24 e 26 com 10 ng de G28-1 scFv em uma PCR processada sob as condições idênticas às da VK acima. Esse produto de PCR tinha os sítios de restrição

5 NheI na extremidade 5' da V_H e XhoI na extremidade 3'. Em função de ter sido projetada uma superposição de identidade de sequência significativa nos iniciadores 23 e 24, a V_K e a V_H foram diluídas 5 vezes, e depois adicionadas em uma proporção de 1:1 a uma PCR usando os iniciadores

10 flangeadores 25 e 26, e um scFv de comprimento total foi amplificado da forma acima mostrada por prolongamento do tempo de extensão a 68°C de 15 segundos para 45 segundos. Esse produto de PCR representava todo o G28-1 scFv como um

15 fragmento PinAI-XhoI, e foi purificado por purificação em uma coluna MinElute (Qiagen) para a remoção de iniciadores, enzimas e sais em excesso. O eluato foi digerido até o fim com PinAI (Invitrogen) e XhoI (Roche) em tampão H 1X (Roche) a 37°C por 4 horas em um volume de 50 µl. O produto de PCR digerido foi então submetido à eletroforese em um

20 gel de agarose 1%, o fragmento foi removido do gel e repurificado em uma coluna MinElute usando tampão QG e incubando a mistura de gel-tampão a 50°C por 10 minutos com mistura intermitente para dissolver a agarose e, a seguir, a purificação na coluna foi idêntica à usada para remoção

25 do iniciador pós-PCR. G28-1 LH digerido com 3 µl de PinAI-XhoI foi combinado com SMIP pD18-n2H7sssIgG1 digerido com 1 µl PinAI-XhoI em uma reação de 10 µl com 5 µl de 2X tampão de ligação LigaFast (Promega, Madison, WI) e 1 µl de DNA T4 ligase (Roche), bem misturados e incubados em temperatura

30 ambiente por 10 minutos. Três µl dessa ligação foram então

transformados em TOP 10 competente (Invitrogen) usando o protocolo do fabricante. Esses transformantes foram plaqueados em placas de ágar LB com 100 µg/ml de carbenicilina (Teknova), e incubados de um dia para o outro a 37°C. Após 18 horas de crescimento, as colônias foram escolhidas e inoculadas em 1 ml de Caldo T (Teknova) contendo 100 µg/ml de carbenicilina em uma placa profunda de 96 poços, e cresceram de um dia para o outro em uma incubadora em agitação a 37°C. Após 18-24 horas de crescimento, o DNA foi isolado de cada cultura de um dia para o outro usando o kit QIAprep 96 Turbo (Qiagen) no BioRobot 8000 (Qiagen). Dez µl de cada clone foram então digeridos com enzimas de restrição HindIII e XhoI em tampão B 1X em um volume de reação de 15 µl. O DNA digerido foi submetido à eletroforese em géis de agarose E 1% (Invitrogen, CA) para análise de sítios de restrição. Os clones que continham um fragmento HindIII-XhoI do tamanho correto tiveram suas seqüências verificadas. A HL de SMIP G28-1 foi construída de forma similar por colocação de um sítio PinAI na extremidade 5' e um ligante (G4S)₄ terminando em um sítio Nhe I do G28-1 V_H usando os iniciadores 29, 30 31 e 32 da Tabela X acima. A VK foi alterada por PCR usando os iniciadores 33 e 34 da Tabela X, de tal forma que um sítio NheI fosse introduzido na extremidade 5' da VK e XhoI na extremidade 3'. Essas PCRs foram então combinadas como acima e amplificadas com os iniciadores flanqueadores 29 e 34, para gerar um DNA de G28-1 scFv intacto na orientação V_H-V_L que foi clonado em SMIP pD18-(n2H7)sssIgG1 digerido com PinAI-XhoI, exatamente como ocorreu com o SMIP G28-1 LH.

Construção de LH/HL de 2H7sssIgG1-STD1-G28-1

Usando as HLs de G28-1 LH e SMIP G28-1 como modelos, os domínios de ligação anti-CD37 de LH e HL foram alterados por PCR de tal forma que seus sítios de restrição
 5 flanqueadores fossem compatíveis com o cassete de *scorpion*. Um sítio EcoRI foi introduzido na extremidade 5' de cada scFv usando o iniciador 27 (LH) ou 36 (HL) e um códon de parada/sítio XbaI na extremidade 3' usando o iniciador 28 (LH) ou 35 (HL). Os DNAs resultantes foram clonados em
 10 pD18-2H7sssIgG-STD1 digerido com EcoRI-XbaI.

Construção de HL de 2H7sssIgG1-Hx-G28-1

DNAs de HL de 2H7sssIgG1-Hx-2e12 foram digeridos com BsrGI e EcoRI, e o fragmento de 325 bp que consiste na extremidade do terminal C de IgG1 e ligante. Esses serviram
 15 de substituintes para a região equivalente na HL de 2H7sssIgG1-STD1-G19-4 por remoção do ligante STD1 com o uso de BsrGI-EcoRI e substituindo-o com os ligantees correspondentes dos clones de HL de 2H7sssIgG1-Hx-2e12.

Construção do domínio de ligação anti-CD3

20

Tabela 4

25

Nº	Nome dos iniciadores de PCR	Sequência 5'-3'	ID. DE SEQ. Nº
1	hVK3L-F3H3	GCGATAAAGCTTGCCGCCATGGAA GCACCAGCGCAGCTTCTCTTCC	15
2	hVK3L-F2	ACCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTG CTACTCTGGCTCCCAGATACCACCG GGCTCCCAGATACCACCGGTCAAAT	16
30 3	hVK3L-F1-2H7VL	TGTTCTCTCCCAGTCTCCAG GCGATAGCTAGCCAGGCTTATCTAC	17
4	2H7VH-NheF	AGCAGTCTGG GCGATAGCTAGCCCCACCTCCTCCA	18
5	G4S-NheR	GATCCACCACCGCCCGAG GCGTACTCGAGGAGACGGTGACCGT	19

5

10

15

20

			TGCAACAGTCTGGACCTG	93
			ACCGCCACCAGAGGAGACGGTGACCGT	
25	64	194-HL-HR1	GGTCCCTGCGCCCCAGACATCGAAGTAC	94
			ACCTCCTCCAGATCCACCACCGCCCG	
	65	194-HL-HR0	AGCCACCGCCACCAGAGGAGACGGTG	95
			GCGGGGGAGGTGGCAGTGCTAGCGA	
	66	194-HL-LF1	CATCCAGATGACACAGACTACATC	96
			GCGAATACTCGAGCGTTTGGTTACCA	
	67	194-HL-LR3Xho	GTTTGGTG	97
			GCGATATCTAGATTACCGTTTGGTTAC	
	68	194-HL-LR3Xba	CAGTTTGGTG	98
			GCGTATGAGAATTCAGAGGTCCAGCTG	
30	69	194-HL-HF1R1	CAACAGTCTGGACCTG	99
			GCGTATGAGAATTCTGACATCCAGA	
	70	194-LH-LF1R1	TGACACAGACTACATC	100
			GCGTATCTAGATTAGGAGACGGTGACC	
	71	194-LH-HR1Xba	GTGGTCCCTGCGCCCCAGACATCGAAG	101

Tabela 4. Oligonucleotídeos usados para gerar domínio de
5 ligação anti-CD3 a partir da sequência G19-4 scFv.

O domínio de ligação G19-4 foi sintetizado por extensão dos iniciadores de oligonucleotídeos superpostos como descrito previamente. A PCR da cadeia leve foi feita em duas etapas, iniciando por combinação dos iniciadores
10 43/44, 42/45, 41/46 e 40/47 em concentrações de 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M e 40 μ M, respectivamente, em Platinum PCR Supermix Hi-Fidelity por 30 ciclos de 94°C, 20 segundos, 60°C, 10 segundos, 68°C, 15 segundos. Um μ l do produto de PCR resultante foi re-amplificado usando uma mistura de
15 iniciadores de 39/48 (10 μ M), 38/49 (20 μ M) e 37/50 (40 μ M) para a orientação LH, ou 66/67 (40 μ M) para a orientação HL, usando as mesmas condições de PCR, com exceção da extensão a 68°C, que foi aumentada para 25 segundos. A VK na orientação LH foi ligada por PinAI na extremidade 5' e
20 por NheI na extremidade 3', enquanto a orientação HL tinha NheI na extremidade 5' e XhoI na extremidade 3'.

Para sintetizar a cadeia pesada, foram preparadas misturas de iniciadores com as mesmas concentrações acima por combinação dos iniciadores 56/57, 55/58, 54/59 e 53/60
25 para a etapa da primeira de PCR. Na segunda PCR, os iniciadores 52/61 (20 μ M) e 51/62 (50 μ M) foram amplificados com 1 μ l da primeira PCR usando as mesmas condições de PCR que a segunda PCR da cadeia leve para fazer a orientação LH com NheI na extremidade 5' e XhoI na
30 extremidade 3'. Os iniciadores 52/61 (10 μ M), 63/64 (20 μ M),

63 (20 μ M)/65 (40 μ M) e 63(20 μ M)/65 (80 μ M) foram combinados em uma segunda PCR com 1 μ l da PCR anterior, para criar a cadeia pesada na orientação HL com PinAI na extremidade 5' e NheI na extremidade 3'. Como observado em
 5 relação às construções anteriores, foi projetada uma superposição suficiente nos iniciadores centrada em torno do sítio NheI, de tal forma que a LH de G19-4 foi sintetizada por combinação das PCRs da cadeia pesada e leve na orientação LH e re-amplificação com os iniciadores
 10 flangeadores 37 e 62, e a HL de G19-4 foi sintetizada por combinação das PCRs da HL e re-amplificação com iniciadores 63 e 67.

Os produtos de PCR de LH/HL de G19-4 de comprimento total foram separados por eletroforese em gel de agarose,
 15 removidos do gel e purificados com colunas MinElute Qiagen, como descrito anteriormente. Esses DNAs foram então clonados em TOPO em pCR2.1 (Invitrogen), transformados em TOP 10 e as colônias avaliadas, primeiro por tamanho de fragmento EcoRI, e depois por seqüenciamento de DNA. LH/HL
 20 de G19-4 foram então clonadas em pD18-IgG1 por meio de PinAI-XhoI para expressão em células mamíferas.

Construção de LH/HL de 2H7sssIgG1-STD1-G19-4

Usando SMIPs de LH de G19-4 e HL de G19-4 como modelos, os domínios de ligação anti-CD3 de LH e HL foram
 25 alterados por PCR de tal forma que seus sítios de restrição flangeadores fossem compatíveis com o cassete de *scorpion*. Um sítio EcoRI foi introduzido na extremidade 5' de cada scFv usando o iniciador 27 (LH) ou 36 (HL) e um códon de parada/sítio XbaI na extremidade 3' usando o iniciador 28
 30 (LH) ou 35 (HL). Os DNAs resultantes foram clonados em

pD18-2H7sssIgG-STD1 digerido com EcoRI-XbaI.

Construção de HL de 2H7sssIgG1-Hx-G19-4

DNAs de HL de 2H7sssIgG1-Hx-2e12 foram digeridos com BsrGI e EcoRI, e o fragmento de 325 bp que consiste na
5 extremidade do terminal C do IgG1 e ligante. Esses serviram de substitutos para a região equivalente na HL de 2H7sssIgG1-STD1-G19-4 por remoção do ligante STD1 com o uso de BsrGI-EcoRI e substituindo-o com os ligantees correspondentes dos clones de HL de 2H7sssIgG1-Hx-2e12.

10 Ficam evidentes a partir da consideração das diversas proteínas de ligação multivalentes aqui reveladas as características das moléculas que são passíveis de combinação na formação das moléculas da invenção. Essas características incluem o domínio de ligação 1, uma sub-
15 região constante, incluindo um domínio de dobradiça ou dobradiça-like, um domínio de ligante e um domínio de ligação 2. A característica modular intrínseca do design dessas novas proteínas de ligação faz com que seja fácil para aqueles habilitados na técnica manipular a sequência
20 de DNA nas extremidades do terminal N e/ou do terminal C de qualquer módulo desejável, de tal forma que ela possa ser inserida em praticamente qualquer posição para criar uma nova molécula que exibe funcionalidade alterada ou aumentada comparada com a(s) molécula(s) parente(s) da qual
25 foi derivada. Por exemplo, qualquer domínio de ligação derivado de um membro da superfamília das imunoglobulinas é contemplado como o domínio de ligação 1 ou como o domínio de ligação 2 das moléculas de acordo com a invenção. Os domínios de ligação derivados incluem domínios que possuem
30 seqüências de aminoácidos, e até mesmo seqüências de

polinucleotídeos codificadoras, que possuem uma correspondência uma a uma com a seqüência de um membro da superfamília das imunoglobulinas, além de variantes e derivados que preferivelmente compartilham 80%, 90%, 95%, 5 99% ou 99,5% de identidade de seqüência com um membro da superfamília das imunoglobulinas. Esses domínios de ligação (1 e 2) estão preferivelmente ligados a outros módulos das moléculas de acordo com a invenção por meio de ligantes que podem variar em termos de seqüência e comprimento, como 10 aqui descrito em outra seção, desde que os ligantes sejam suficientes para fornecer qualquer espaçamento e flexibilidade necessários para que a molécula obtenha uma estrutura terciária funcional. Outro módulo das proteínas de ligação multivalentes é a região de dobradiça, que pode 15 corresponder à região de dobradiça de um membro da superfamília das imunoglobulinas, mas pode ser uma variante desta, por exemplo, as regiões de dobradiça "CSC" ou "SSS" aqui descritas. Além disso, a sub-região constante compreende um módulo das proteínas de acordo com a invenção 20 que pode corresponder a uma sub-região de uma região constante de um membro da superfamília das imunoglobulinas, o que é tipificado pela estrutura de uma sub-região constante da dobradiça- C_{H2} - C_{H3} . Variantes e derivados de sub-regiões constantes também são contemplados, possuindo 25 preferivelmente seqüências de aminoácidos que compartilham 80%, 90%, 95%, 99% ou 99,5% de identidade de seqüência com um membro da superfamília das imunoglobulinas.

As estruturas primárias exemplares das características dessas moléculas são apresentadas na Tabela 5, que revela a 30 seqüência de polinucleotídeos e de aminoácidos cognata de

domínios de ligação 1 e 2 ilustrativos, além da estrutura primária de uma sub-região constante, incluindo um domínio de dobradiça ou dobradiça-like, e um ligante que pode ser interposto, por exemplo, entre região da extremidade do terminal C de uma sub-região constante e a extremidade do terminal N de um domínio de ligação 2 de uma proteína de ligação multivalente. Exemplares adicionais das moléculas de acordo com a invenção incluem as características descritas acima nas quais, por exemplo, um ou ambos os domínios de ligação 1 e 2 compreendem um domínio derivado de um domínio V_L ou V_L -like de um membro da superfamília das imunoglobulinas e um domínio V_H ou V_H -like derivado do mesmo membro ou de um membro diferente da superfamília das imunoglobulinas, com esses domínios separados por um ligante tipificado por qualquer um dos ligantes aqui revelados. São contempladas moléculas nas quais a orientação desses domínios é V_L - V_H ou V_H - V_L para BD1 e/ou BD2. Uma apresentação mais completa das estruturas primárias de várias características das moléculas de ligação multivalentes de acordo com a invenção é encontrada na tabela anexada ao final desta especificação. A invenção ainda compreende polinucleotídeos que codificam essas moléculas.

Tabela 5

25

30

Domínio de ligação	Sequência de nucleotídeos	Sequência de aminoácidos	ID. DE SEQ. N ^{os} (Seq. de aminoácidos)
2H7 LH	atggattttcaagtgcagattttcag ctctctgctaactcagtgcttcagtca taatgtccagaggacaaattgtttctc tcccagtcctccagcaatcctgtctgc atctccaggggagaaggtcacaaatga cttgcagggccagctcaagtgttaagt tacatgcactggtaccagcagaagcc aggatcctcccccaaacctggatlt atgccccatccaacctggcttctgga gtccctgctcgcttcagtgccagtggtg gctcgggacctcttactctctcacaa tcagcagagtgaggctgaagatgct gccacttattactgccagcagtggtgag ttttaaccacccacgttcggtgctg ggaccaagctggagctgaagatggc ggtggctcgggcggtggtggatctgg aggaggtgggagctctcaggcttato tacagcagtcctgggctgagtcggtg aggcctggggcctcagtgaaagtgtc ctgcaaggcttctggctacacattta ccagttacaatatgcactgggtaaag cagacacctagacagggcctggaatg gattggagctatttatccaggaaatg gtgatacttctacaatcagaagtgc aaggggcaaggccacactgactgtaga caaatctctcagcacagcctacatgc agctcagcagcctgacatctgaagac tctgcggtctatttctgtgcaagagt ggtgtactatagtaactcttactggt acttcgatgtctggggcacagggacc acggtcacggtctct	mdfqvqifsflilisavimsrgqivls qspailsaspgekvtmtcrasssvaym hwyqqkpgsspkpwiypsnlasgvpa rfsgsgsgtsysltisrveaadaatyy cqqwsfnpptfgagtklelkdgqsgg ggsggggsaqaylqsgaesvrpgasv kmsckasgytftsynmhvkvgtprqgl ewigaiypngdtsynqkfkgtatltv dkssstaymqissltedsavvyfcarv vyyssywyfdvwtggttvtvs	1 (2)

Domínio de ligação	Sequência de nucleotídeos	Sequência de aminoácidos	ID. DE SEQ. Nº (Seq. de aminoácidos)
2e12 LH	atggattttcaagtgcagattttcag cttctgtctaatacagtgcttcagtc taatgtccagaggagtcgacattgtg ctcaccacaatctccagcttctttggc tgtgtctctaggtcagagagccacca tctcctgcagagccagtgaaagtgtt gaatatattatgtcacaaagtttaatgca gtggtaccaacagaaaccaggacagc caccacaactcctcatctctgtctgt agcaacgtagaatctgggtccctgc caggttttagtggcagtggtctgtgga cagactttagcctcaacatccatcct gtggaggaggatgatattgcaatgta ttctctgcagcaaaagtaggaaggttc catggacgttcgggtggaggcaccaag ctggaaatcaaacgggtggcggtgg atccggcggaggtgggtcgggtggcg gcggtatctcaggtgcagctgaaggag tcaggacctggcctgggtggcgccctc acagagcctgtccatcacatgcacgg tctcaggggttctcattaaccggctat gggtgtaaaactgggttcgccagcctcc aggaaagggtctggagtggctgggaa tgatatggggtgatggaagcacagac tataattcagctctcaaatccagact atcgatcaccaggacaactccaaga gccaagttttcttaaaaatgaacagt ctgcaactgatgacacagccagata ctactgtgcccgagatggttatagta actttcattactatgttatggactac tggggtcaaggaaacctcagtcacctg ctcctct	MDFQVQIFSFLISASVIMSRGVDIVL TQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEY YVTSLMQWYQKPGQPPKLLISAASNV ESGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEED DIAMYFCQSRKVPWTFGGGKLEIKR GGGGSGGGSGGGGSQVQLKESGPGLV APSQSLITCTVSGFSLTGYGVNWRQ PPGKLEWLGMIWGDGSTDYNSALKSR LSITKDNSKSQVFLKMNLSLQDDTARY YCARDGYSNFHYVMDYWGQTSVTVS S	3 (4)
2e12 HL	atggattttcaagtgcagattttcag cttctgtctaatacagtgcttcagtc taatgtccagaggagtcaggtgcag ctgaaggagtcaggacctggcctggt ggcgccctccagagcctgtccatca catgcacogtctcaggggttctcatta accggctatggtgtaaaactgggttcg ccagcctccaggaaagggtctggagt ggctgggaatgatggtgggtgatgga agcacagactataattcagctctcaa atccagactatcgatcaccaggaca actccaagagccaagtttcttaaaa atgaacagttctgcaactgatgacac agccagatactactgtgcccgagatg gttatagtaacttctattactatggt atggactactgggtcaaggaaacctc agtcaccgtctcctctgggggtggag gctctggtggcggtggatccggcgga ggtgggtcgggtggcgcggtatctga cattgtgctcaccacaatctccagctt clttggctgtgtctctaggtcagaga gccaccatctcctgcagagccagtg aagtgttgaatattatgtcacaaagt taatgcagtggtaccaacagaaacca	MDFQVQIFSFLISASVIMSRGVQVQL KESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTG YGVNWRQPPGKLEWLGMIWGDGSTD YNSALKSRLSITKDNSKSQVFLKMNLS QTDDTARYYCARDGYSNFHYVMDYWG QGT'SVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG GSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR ASESVEYYVTSLMQWYQKPGQPPKLLI SAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNI HPVEEDDIAMYFCQSRKVPWTFGGGT KLEIKR	5 (6)

Dominio de ligação	Sequência de nucleotídeos	Sequência de aminoácidos	ID. DE SEQ. N°s (Seq. de aminoácidos)
5	ggacagccacccaaactcctcatctc tgctgctagcaacgtagaatctgggg tccctgccagggttagtggcagtg tctgggacagactttagcctcaacat ccatcctgtggaggaggatgatattg caatgtattttctgtcagcaaagtagg aaggttccatggacgttcggtggagg caccaagctggaaatcaaacgt		
10	G28-1 LH	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCTSE NVYSYLAWYQQQKQKSPQLLVSAKTL AEGVPSRFSGSGSGTQFSLKISSLQPE DSGSYFCQHHSDNPWTFGGSTELEIKG GGSGGGGGSGGGGSASAVQLQSGPEL EKPGASVKISKASGYSFTGYNNMWVK QNNKSLLEWIGNIDPHYGGTTYNRKPK GKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSA VYYCARSVGPMDYWGQGTSTVTVS	102 (103)
15			
20			
25	G28-1 HL	EVQLQQSGPELVKPGASMKISKASGY SFTGYIVNWLKQSHGKNLEWIGLINPY KGLTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM ELLSLTSEDSAVYYCARSGYGDSWDY FDVWGAGTTVTVSSGGGSGGGSGGG SGGGGSASDIQMTQTTSSLSASLGR VTISCRASQDIRNYLNWYQQKPDGTVK LLIYYTSLRHSQVPSRFSGSGSGTDYS LTIANLQPEDIAITYFCQQGNTLPWTFG GGTKLVTKRS	104 (105)
30			

	Domínio de ligação	Sequência de nucleotídeos	Sequência de aminoácidos	ID. DE SEQ. N ^{os} (Seq. de aminoácidos)
5		acattcgcaattattttaactggtat cagcagaaaccagatggaactgttaa actcctgatctactacacatcaagat tacactcaggagtcacatcaagggtc agtggcagtggtcttggaacagatta ttctctcaccattgccaacctgcaac cagaagatattgccacttacttttgc caacagggtaatacgtctccgtggac gttcgggtggaggcaccaaactggtaa ccaaacgctcgag		
10	G19-4 LH	accgggtgacatccagatgacacagac tacatcctcctgtctgcctctctgg gagacagagtcaccatcagttgcagg gcaagtcaggacattcgcaattattt aaactggtatcagcagaaaccagatg gaactgttaaactcctgatctactac acatcaagattacactcaggagtcac atcaaggttcagtggcagtggtctg gaacagattattctctcaccattgcc aacctgcaaccagaagatattgccac ttacttttgccaacagggttaatacgc ttccgtggacgttcgggtggagcacc aaactggttaacaaacgggtggcgg tggctcgggcgggtggatctggag gaggtgggagcgttagcaggtccag ctgcaacagtcctggacctgaactggt gaagcctggagcttcaatgaagattt cctgcaaggcctctggttactcattc actggctacatcgtgaactggctgaa gcagagccatggaaagaaccttgagt ggattggacttattaatccatacaaa ggtcttactacctacaaccagaaatt caagggaaggccacattaactgtag acaagtcacacagcacagcctacatg gagctcctcagtcctgacatctgaaga ctctgcagtcctattactgtgcaagat ctgggtactatgggactcggactgg tacttcgatgtctggggcgcaggac cacggtcaccgtctcctcgag	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQ DIRNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIANLQPE DIATYFCQQGNILPWTFGGGTKLVTKR GGGSGGGSGGGSGGSAEVQLQQSGPE LVKPGASMKISCKASGYSTGYIVNWL KQSHGKNLEWIGLINPYKGLTTYNQKF KGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDS AVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGAGTTV TVSS	106 (107)
15				
20				
25	G19-4 HL	accgggtgaggtccagctgcaacagtc tggacctgaactggtgaagcctggag cttcaatgaagatttccctgcaaggcc tctggttactcattcactggctacat cgtgaactggctgaagcagagccatg gaaagaacctgagtggtatggactt attaatccatacaaaaggcttactac ctacaaccagaaattcaagggaagg ccacattactgttagacaagtcattcc agcacagcctacatggagctcctcag ctgacatctgaagactctgcagtcct attactgtgcaagatctgggtactat ggtgactcggactggtacttcgatgt ctggggcgcagggaaccggtcaccg tctcctctggtggcgggtggctcgggc ggtggtggatctggaggaggtgggag cgctagcgacatccagatgacacaga	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGY SFTGYIVNWLKQSHGKNLEWIGLINPY KGLTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM ELLSLTSEDSAVYYCARSGYYGDSWDY FDVWGAGTTVTVSSGGGSGGGSGGG GSASDIQMTQTSSLSASLGDRVTISC RASQDIRNYLNWYQQKPDGTVKLLIYY TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIAN LQPEDIATYFCQQGNILPWTFGGGTKL VTKRS	108 (109)

Domínio de ligação	Sequência de nucleotídeos	Sequência de aminoácidos	ID. DE SEQ. N°s (Seq. de aminoácidos)
5	ctacatcctcctgtctgctctctg ggagacagagtcaccatcagttgcag ggcaagtcaggacattcgcaattatt taaactggatcagcagaaaccagat ggaactgttaaactcctgatctacta cacatcaagattacactcaggagtc catcaagggttcagtgccagtggtct ggaacagattattctctcaccattgc caacctgcaaccagaagatattgcc cttacttttgccaacagggtatagc cttcctggagcttgggtggaggcac caaactggtaaccaacgctcgag		

Região de dobradiça	Sequência de nucleotídeos	Sequência de aminoácidos	ID. DE SEQ. N° (seq. de aa)
10	sss(s) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatctccaccgagctca	EPKSSDKTHTSPSS 230 (231)
	csc(s) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatctccaccgtgctca	EPKSCDKTHTSPPCS 232 (233)
	ssc(s) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatctccaccgtgctca	EPKSSDKTHTSPPCS 110 (111)
	scc(s) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatgtccaccgtgctca	EPKSSDKTHTCPPCS 112 (113)
15	css(s) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatctccaccgagctca	EPKSCDKTHTSPSS 114 (115)
	scs(s) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatgtccaccgagctca	EPKSSDKTHTCPPSS 116 (117)
	ccc(s) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatgtccaccgtgctca	EPKSCDKTHTSPPCS 118 (119)
	ccc(p) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatgtccaccgtgccca	EPKSCDKTHTSPPCP 120 (121)
	sss(p) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatctccaccgagccca	EPKSSDKTHTSPSP 122 (123)
20	csc(p) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatctccaccgtgccca	EPKSCDKTHTSPPCP 124 (125)
	ssc(p) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatctccaccgtgccca	EPKSSDKTHTSPPCP 126 (127)
	scc(p) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatgtccaccgtgccca	EPKSSDKTHTCPPCP 128 (129)
	css(p) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatctccaccgagccca	EPKSCDKTHTSPSP 130 (131)
	scs(p) - hIgG1	gagcccaaactcttctgacaaaact cacacatgtccaccgagccca	EPKSSDKTHTCPPSP 132 (133)
25	scppcp	agttgtccaccgtgccca	SCPPCP 134 (135)
	EFD	Sequência de nucleotídeos	Sequência de aminoácidos
	hIgG1 (P238S) C _{H2} C _{H3}	gcacctgaactcctgggtggatcg tcagttcttctcttcccccaaaa cccaaggacacctcatgatctcc cggacccctgaggtcacatgcgtg gtggtggacgtgagccacgaagac	APELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYT

5		cctgaggtcaagttcaactggtac gtggacggcgtggaggtgcataat gccaaagacaaagccgcgggaggag cagtacaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcac caggactggctgaatggcaaggag tacaagtgcaaggtctccaacaaa gccctcccagccccatcgagaaa acaatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacacc ctgcccccatcccggatgagctg accaagaaccaggtcagcctgacc tgcttggtcaaaggcttctatccc agcgacatcgccgtggagtgaggag agcaatgggcagccggagaaacac tacaagaccacgcctcccgctgctg gactccgacggctccttcttctc tacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtc ttctcatgctccgtgatgcatgag gctctgcacaaccactacacgcag aagagcctctccc tgtctccgggtaaatga	LPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG K	
15	hIgG1 (P331S) C _{H2} C _{H1}	gcacctgaactcctgggtggaccg tcagttcttctcttcccccaaaa cccaaggacacctcatgatctcc cggacccctgaggtcacatgctg gtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagltcaactggtac gtggacggcgtggaggtgcataat gccaaagacaaagccgcgggaggag cagtacaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcac caggactggctgaatggcaaggag tacaagtgcaaggtctccaacaaa gccctcccagccctccatcgagaaa acaatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacacc ctgcccccatcccggatgagctg accaagaaccaggtcagcctgacc tgcttggtcaaaggcttctatccc agcgacatcgccgtggagtgaggag agcaatgggcagccggagaaacac tacaagaccacgcctcccgctgctg gactccgacggctccttcttctc tacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtc ttctcatgctccgtgatgcatgag gctctgcacaaccactacacgcag aagagcctctccc tgtctccgggtaaatga	APFLLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG K	144 (145)
25	hIgG1 (P238S/ P331S) C _{H2} C _{H1}	gcacctgaactcctgggtggatcg tcagttcttctcttcccccaaaa cccaaggacacctcatgatctcc cggacccctgaggtcacatgctg gtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagltcaactggtac gtggacggcgtggaggtgcataat gccaaagacaaagccgcgggaggag cagtacaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcac caggactggctgaatggcaaggag tacaagtgcaaggtctccaacaaa gccctcccagccctccatcgagaaa acaatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacacc ctgcccccatcccggatgagctg accaagaaccaggtcagcctgacc tgcttggtcaaaggcttctatccc agcgacatcgccgtggagtgaggag agcaatgggcagccggagaaacac tacaagaccacgcctcccgctgctg gactccgacggctccttcttctc tacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtc ttctcatgctccgtgatgcatgag gctctgcacaaccactacacgcag aagagcctctccc tgtctccgggtaaatga	APFLLGGSSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG K	146 (147)
30		gtcagcgtcctcaccgtcctgcac		

5		caggactggctgaatggcaaggag tacaagtgcagggtctccaacaaa gccccccagcctccatcgagaaa acaatctccaagccaaggagcag ccccgagaaccacaggtgtacacc ctgcccccaccccggaagagctg accaagaaccagggtcagcctgacc tgccctggtaaaaggcttctatccc agcgacatcgccgtggagtgaggag agcaatgggcagcgggagacaac tacaagaccacgctcccgctgtg gactccgacgggtctcttctctc tacagcaagctcaccgtgacaaag agcagggtggcagcagggaacgtc ttctcatgctccgtgatgcatgag gctctgcacacccaactacacgag aagagcctctccctgtctccgggt aaatga		
	Vinculador	Sequência de nucleotídeos	Sequência de aminoácidos	Identificador de sequência
10	STD1	aattatgggtggcgggtggctcgggc gggtgggtggtatctggagagggtggg agtgggaattct	NYGGGGSGGGSGGGSGNS	148 (149)
	STD2	aattatgggtggcgggtggctcgggc gggtgggtggtatctggagagggtggg agtgggaattatgggtggcgggtggc tcgggcgggtgggtggtatctggagga gggtgggagtgggaattct	NYGGGGSGGGSGGGSGNYGGGG SGGGSGGGSGNS	150 (151)
15	H1	aattct	NS	152 (153)
	H2	gggtggcgggtggctcgggaattct	GGGGSGNS	154 (155)
	H3	aattatgggtggcgggtggctctggg aattct	NYGGGGSGNS	156 (157)
	H4	gggtggcgggtggctcgggcgggtggg ggatctgggaattct	GGGGSGGGSGNS	158 (159)
	H5	aattatgggtggcgggtggctcgggc gggtgggtggtatctgggaattct	NYGGGGSGGGSGNS	160 (161)
	H6	gggtggcgggtggctcgggcgggtggg ggatctggggaggagggcagcggg aattct	GGGGSGGGSGGGSGNS	162 (163)
	H7	gggtgtccacattgtccgaattct	GCPGCPNS	164 (165)
	(G4S) 3	gggtggcgggtggatccggcggaggt gggtcgggtggcggcggatct	GGSGGGSGGGG	166 (167)
	(G4S) 4	gggtggcgggtggctcgggcgggtggg ggatctggagagggtgggagcggg ggagggtggcagt	GGSGGGSGGGSGGGG	168 (169)

Tabela 5. Estruturas primárias (seqüências de polinucleotídeos e de aminoácidos cognata) de características exemplares de moléculas de ligação multivalentes.

Exemplo 8

Estudos de ligação e funcionais com proteínas de fusão multiespecíficas alternativas

Foram realizados experimentos equivalentes aos experimentos descritos acima para a molécula de ligação multiespecífica CD20-IgG-CD28 (de fusão) prototípica para cada uma das moléculas de ligação multivalentes adicionais descritas acima. Em geral, os dados obtidos para essas moléculas adicionais equivalem aos resultados observados para a molécula-protótipo. Alguns dos resultados que se

sobressaem nesses experimentos serão apresentados abaixo. A Figura 14 mostra resultados de estudos de bloqueio realizados em uma das novas moléculas, nos quais tanto BD1 quanto BD2 se ligam aos antígenos-alvos na mesma célula ou
5 tipo de célula, nesse caso, CD20 e CD37. Essa proteína de fusão multivalente e multiespecífica (de fusão) foi projetada com o domínio de ligação 1 se ligando ao CD20 (2H7; orientação V_L-V_H), e o domínio de ligação 2 se ligando ao CD37, V_L-V_H (LH) ou V_H-V_L (HL) de G28-1. O
10 experimento foi realizado a fim de demonstrar as propriedades multiespecíficas da proteína.

Estudos de bloqueio: células B linfoblastóides Ramos ou BJAB ($2,5 \times 10^5$) foram pré-incubadas em placas de 96 poços com fundo em "V" em meio de coloração (PBS com soros
15 de camundongo 2%) com anticorpo muríneo anti-CD20 (25 $\mu\text{g/ml}$) ou anticorpo muríneo anti-CD37 (10 $\mu\text{g/ml}$), ambos em conjunto, ou meio de coloração isoladamente por 45 minutos no gelo no escuro. Os anticorpos de bloqueio foram pré-incubados com as células por 10 minutos em temperatura
20 ambiente, antes da adição da proteína de ligação multiespecífica (de fusão) nas faixas de concentração indicadas, normalmente de 0,02 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$, e incubados por mais 45 minutos no gelo no escuro. As células foram lavadas 2 vezes em meio de coloração, e incubadas por
25 uma hora no gelo com anti-IgG humana de cabra conjugada a FITC (1:100) Caltag (Burlingame, CA) em meio de coloração, para detectar a ligação das proteínas de ligação multiespecíficas (de fusão) às células. As células foram então lavadas 2 vezes com PBS, e fixadas com
30 paraformaldeído 1% (N° de Catálogo 19943, USB, Cleveland,

Ohio). As células foram analisadas por citometria de fluxo com a utilização de um instrumento FACsCalibur e do software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). Cada série de dados tabula a ligação da proteína de fusão de HL de 2H7-sss-hIgG-STD1-G28-1 na presença de anticorpos de bloqueio de CD20, CD37 ou tanto CD20 quanto CD37. Embora esse experimento tenha usado um dos ligantes clivados, somente a presença de ambos os anticorpos de bloqueio elimina completamente a ligação pela proteína de ligação multiespecífica (de fusão), demonstrando que a maioria das moléculas possui função de ligação tanto para CD20 quanto para CD37. Os dados foram similares para as duas linhagens celulares testadas nos painéis A e B, Ramos e BJAB, em que o anticorpo de bloqueio de CD20 foi mais eficaz do que o anticorpo de bloqueio de CD37 na redução do nível de ligação observado pela proteína de ligação multiespecífica (de fusão).

Ensaio de ADCC

A Figura 15 mostra os resultados de ensaios de ADCC realizados nas proteínas de ligação multiespecíficas (de fusão) CD20-CD37. Os ensaios de ADCC foram realizados com o uso de células linfoblastóides B BJAB como alvos, e PBMCs humanos como células efetoras. As células BJAB foram marcadas com 500 $\mu\text{Ci/ml}$ de cromato de sódio ^{51}Cr (250 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) por 2 horas a 37°C em IMDM/FBS 10%. As células marcadas foram lavadas três vezes em RPMI/FBS 10%, e ressuspensas a 4×10^5 células/ml em RPMI. Sangue total humano heparinizado foi obtido de doadores internos anônimos, e as PBMCs isoladas por fracionamento sobre gradientes de Meios de Separação de Linfócitos (LSM, ICN

Biomedical). As capas de leucócitos foram coletadas e lavadas duas vezes em RPMI/FBS 10%, antes da ressuspensão em RPMI/FBS 10% em uma concentração final de 5×10^6 células/ml. As células foram contadas por exclusão de azul tripano usando um hemocitômetro, antes de serem usadas em ensaios subseqüentes. Foram adicionadas amostras de reagente ao meio RPMI com FBS 10% a 4 vezes a concentração final, e foram preparadas três diluições seriais de 10 vezes para cada reagente. Esses reagentes foram então adicionados às placas de 96 poços com fundo em "U" a 50 µl/poço para as concentrações finais indicadas. As células BJAB marcadas com ^{51}Cr foram adicionadas às placas a 50 µl/poço (2×10^4 células/poço). Os PBMCs foram então adicionados às placas a 100 µl/poço (5×10^5 células/poço) até uma proporção final de 25:1 de células efetoras (PBMC):alvo (BJAB). As células efetoras e alvo foram adicionadas ao meio isoladamente para medir o nível de morte de fundo. As células marcadas com ^{51}Cr foram adicionadas ao meio isoladamente para medir a liberação espontânea de ^{51}Cr ao meio com NP40 5% (N° de Catálogo 28324, Pierce, Rockford, IL) para medir a liberação máxima de ^{51}Cr . As reações foram preparadas em poços em triplicata de uma placa de 96 poços. As proteínas de ligação multiespecíficas (de fusão) foram adicionadas aos poços em uma concentração final que varia de 0,01 µg/ml a 10 µg/ml, como indicado nos gráficos. Cada série de dados tabula uma proteína de ligação multiespecífica (de fusão) diferente ou os SMIPs de especificidade única correspondentes nas faixas de titulação descritas. Deixou-se que as reações evoluíssem por 6 horas a 37°C em CO₂ 5%, antes da coleta e contagem.

Vinte e cinco µl do sobrenadante de cada poço foram então transferidos para uma Placa Luma 96 (N° de Catálogo 6006633, Perkin Elmer, Boston, Mass) e secos de um dia para o outro em temperatura ambiente. A CPM liberada foi medida em um Packard TopCounNXT. O percentual de morte específica foi calculado subtraindo-se (cpm {média de amostras em triplicata} da amostra - cpm de liberação espontânea)/(cpm de liberação máxima-cpm de liberação espontânea) x 100. Os dados são tabulados como % de morte específica versus concentração de proteína. Os dados demonstram que a proteína de ligação multiespecífica (de fusão) é capaz de mediar a atividade de ADCC contra células que expressam o(s) antígeno(s)-alvo, bem como os SMIPs de especificidade única por CD20 e/ou CD37, mas não mostram aumento no nível dessa função efetora.

Experimentos co-cultivo

A Figura 16 mostra os resultados de experimentos projetados para verificar outras propriedades desse tipo de proteína de ligação multiespecífica (de fusão), na qual o fato de possuir dois domínios de ligação contra alvos expressos na mesma célula ou tipo de célula talvez resulte em efeitos sinérgicos por sinalização/ligação por meio dos dois receptores de superfície ligados. Os experimentos de co-cultivo foram realizados usando PBMCs isolados, como descrito para os ensaios de ADCC acima. Esses PBMCs foram ressuspensos em meio de cultura a 2×10^6 células/ml em um volume final de 500 µl/poço, e cultivados isoladamente ou incubados com SMIPs de especificidade única por CD20, CD37, CD20+CD37, ou com a proteína de ligação multiespecífica (de fusão) usando o ligante H7, [HL de 2H7-sss-IgG-H7-G28-1].

Cada um dos reagentes de teste foi adicionado em uma concentração final de 20 µg/ml. Após 24 horas de cultura, não foram observadas diferenças reais no % de células B em cultura; no entanto, quando as células eram submetidas à
5 citometria de fluxo, o agrupamento de células era visível no padrão de coloração FWD X 90 para as culturas contendo a proteína de ligação multiespecífica (de fusão), indicando que as células B que expressam os dois antígenos-alvos estavam engajadas na adesão homotípica. Após 72 horas em
10 cultura, a proteína de ligação multiespecífica (de fusão) produziu a morte de quase todas as células B presentes. A combinação dos dois SMIPs de especificidade única também diminui drasticamente a percentagem de células B, mas não ao nível observado com a molécula de ligação
15 multiespecífica. Esses dados sugerem que a utilização de ambos os domínios de ligação por CD20 e CD37 na mesma molécula multiespecífica resulta na adesão homotípica entre células B, e também pode resultar na ligação de antígenos tanto CD20 quanto CD37 na mesma célula. Sem se prender a
20 uma teoria, o efeito sinérgico na eliminação de células-alvo pode ser causado: (1) pela ligação por meio dos domínios de ligação 1 e 2 nos mesmos tipos de células, e/ou (2) por interações do domínio da função efetora (sub-região constante) das moléculas de ligação multivalentes com
25 monócitos ou outros tipos de células na cultura de PBMCs que resultam em morte retardada. A cinética desse efeito de morte não é rápida, levando mais de 24 horas até ser obtido, indicando que ele pode ser um efeito secundário, sendo necessária a produção de citocinas ou de outras
30 moléculas, antes de os efeitos serem observados.

Ensaio de apoptose

A Figura 17 mostra os resultados de experimentos projetados para explorar a indução de apoptose após tratamento de linhagens de células B com as proteínas de
5 ligação multivalentes e multiespecíficas (de fusão) [HL de 2H7-sss-hIgG-H7-G28-1] ou com SMIPs de especificidade única por CD20 e/ou CD37, isoladamente e em combinação um com o outro. Células Ramos (painel A; ATCC N° CRL-1596) e células Daudi (painel B; ATCC N° CCL-213) foram incubadas de um dia
10 para o outro (24 horas) a 37°C em CO₂ 5% em meio completo Iscoves (Gibco) com FBS 10% a 3 X 10⁵ células/ml, e 5, 10 ou 20 µg/ml de proteínas de fusão. Para experimentos de combinação com os SMIPs de especificidade única, as proteínas foram usadas nas seguintes concentrações: TRU-015
15 (SMIP dirigido contra CD20) = 10 µg/ml, com 5 µg/ml de LH de G28-1 (SMIP dirigido contra CD37). Alternativamente, TRU-015 = 20 µg/ml foi combinado com LH de G28-1 a 10 µg/ml. As células foram então coradas com Anexina V-FITC e iodeto de propídio, usando o Kit de Detecção de Apoptose BD
20 Pharmingen I (N° de Catálogo 556547), e processadas de acordo com as instruções do kit. As células foram gentilmente turbilhonadas, incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos, e diluídas em 400 µl de tampão de ligação antes da análise. As amostras foram
25 analisadas por citometria de fluxo em um instrumento FACsCalibur (Becton Dickinson) usando o software CellQuest (Becton Dickinson). Os dados são apresentados como gráficos de colunas que tabulam a percentagem de células positivas para Anexina V/iodeto de propídio versus tipo de
30 tratamento. Nitidamente, a proteína de ligação

multiespecífica (de fusão) é capaz de induzir um nível significativamente mais elevado de morte apoptótica em ambas as linhagens celulares do que os reagentes de especificidade única, mesmo quando usados em juntos. Essa
5 atividade funcional aumentada reflete uma interação da ligação coordenada de receptores de BD1 e BD2 (específico para CD20 e CD37) sobre as células-alvo.

Exemplo 9

Propriedades de ligação e funcionais de proteínas de 10 ligação multiespecífica (de fusão) 2H7-hIgG-G19-4

Esse exemplo descreve as propriedades de ligação e funcionais das proteínas de fusão multiespecíficas 2H7-hIgG-G19-4. A construção dessas moléculas é descrita no Exemplo 7. A expressão e purificação são como descritas em
15 Exemplos anteriores.

Foram efetuados experimentos de ligação como descrito para as moléculas prévias, exceto que as células-alvo usadas para medir a ligação ao CD3 foram células Jurkat que expressam CD3 em sua superfície. Veja a Figura 18, onde o
20 gráfico superior mostra curvas de ligação obtidas para ligação das moléculas multiespecíficas CD20-CD3 às células Jurkat com o uso de proteínas purificadas diluídas serialmente de 20 a 0,05 µg/ml. A orientação HL da especificidade de G19-4 parece se ligar melhor ao antígeno
25 CD3 do que a orientação LH. O painel inferior mostra as curvas de ligação obtidas para o BD1, o domínio de ligação que reconhece CD20. Todas as moléculas se ligam bem, e em um nível aproximadamente equivalente a um SMIP de especificidade única por CD20.

30 Ensaios de ADCC

Para os dados apresentados na Figura 19, foram realizados ensaios de ADCC como descrito em no Exemplo anterior. Nesse caso, todas as proteínas de fusão eram variantes ou combinações 2H7-hIgG-G19-4 dos SMIPs de especificidade única (2H7, específico para CD20) ou anticorpos (G19-4, específico para CD3). Além disso, para os dados apresentados no painel inferior da Figura 19, as células NK foram eliminadas dos PBMCs antes do uso, por eliminação de glóbulos magnéticos utilizando um aparelho de separação por coluna MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) e microglóbulos magnéticos de CD16 específicos para células NK (N° de Catálogo: 130-045-701). Os dados apresentados nos dois painéis demonstram que todas as moléculas multiespecíficas CD20-hIgG-CD3 medeiam ADCC, independentemente se as células NK são eliminadas ou se são usados PBMC totais no ensaio. Para o TRU-015 ou combinações de G19-4 e TRU015, apenas culturas que contêm células NK podiam mediar ADCC. G19-4 não funcionou bem em qualquer ensaio contra alvos de células BJAB, que não expressam CD3, embora G19-4 possa ter se ligado às células T NK que expressam CD3 e ativado essas células no primeiro ensaio mostrado. A morte observada no painel inferior para as proteínas de ligação multiespecíficas (de fusão) é provavelmente mediada pela ativação de citotoxicidade na população de células T por ligação ao CD3, contra os alvos BJAB que expressam o antígeno CD20. Essa atividade de morte parece ser relativamente insensível à dosagem das moléculas ao longo da faixa de concentração usada, e ainda é significativamente diferente das outras moléculas testadas, até mesmo em uma concentração de 0,01 µg/ml.

Exemplo 10**Molécula de ligação multivalentes**

Outras modalidades include domínios de ligantees derivados de imunoglobulinas. Mais especificamente, as
5 seqüências-fonte para esses ligantees são seqüências obtidas por comparação de regiões presentes entre os domínios *V-like* ou os domínios *V-* e *C-like* de outros membros da superfamília das imunoglobulinas. Como essas seqüências são normalmente expressas como parte do domínio
10 extracelular de receptores da superfície celular, espera-se que elas sejam mais estáveis à clivagem proteolítica, e também não devem ser imunogênicas. Um tipo de seqüência que supostamente não é útil no papel de um ligante para as proteínas de ligação multivalentes (de fusão) é o tipo de
15 seqüência exposto em membros expostos na superfície da superfamília das imunoglobulinas, mas que ocorrem na região interveniente entre o domínio *C-like* e o domínio transmembrana. Muitas dessas moléculas foram observadas em forma solúvel, e são clivadas nessas regiões intervenientes
20 próximas à membrana celular, indicando que as seqüências são mais suscetíveis à clivagem do que o resto da molécula.

Os ligantees descritos acima são inseridos em um SMIP de especificidade única, entre o domínio de ligação e o domínio da função efetora, ou são inseridos em uma das duas
25 posições do ligante possíveis em uma proteína de fusão multivalente (de fusão), como aqui descrito.

Uma listagem completa das seqüências reveladas nesse pedido é fornecida em anexo, e é aqui incorporada por referência em sua totalidade. O código de cores que indica
30 a seqüência de várias regiões ou domínios dos

polinucleotídeos e polipeptídeos em particular é útil na identificação de uma região ou um domínio correspondente na sequência de qualquer uma das moléculas aqui reveladas.

Exemplo 11

5 Matriz de rastreamento para candidatos a *scorpion* que visam células B

Introdução

Como uma forma de identificação de combinações de domínios de ligação pareados de anticorpo monoclonal que
 10 mais provavelmente gerariam moléculas de ligação multivalentes, ou *scorpions*, úteis e potentes contra uma população-alvo, uma série de anticorpos monoclonais contra célula B antígenos foi testada em uma matriz de combinação contra linhagens de células B que representam vários
 15 linfomas não Hodgkin. Para assegurar que todas as comparações possíveis de pareamento de anticorpos que sabida ou supostamente se ligam à célula de interesse são testadas, pode ser usada uma matriz de anticorpos bidimensional para guiar o design de estudos que utilizam
 20 certo tipo de célula. Anticorpos monoclonais contra numerosos antígenos de célula B conhecidos por suas designações de agrupamento (CDs) são registrados na coluna da esquerda. Alguns desses anticorpos (designados pelo(s) antígeno(s) ao qual se ligam especificamente), ou seja,
 25 CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 e CL II (Classe II do MHC), foram incubados, isoladamente ou em combinação com outros membros desse conjunto de anticorpos monoclonais, com células-alvo antígeno-positivas. Os domínios variáveis
 30 desses anticorpos são contemplados como domínios de ligação

em modalidades exemplares das moléculas de ligação multivalentes. Usando os conhecimentos da técnica e procedimentos rotina, aqueles habilitados na técnica são capazes de identificar seqüências de anticorpo adequadas

5 (ácido nucléico que codifica seqüências, além de seqüências de aminoácidos), por exemplo, em bases de dados publicamente disponíveis, para a geração de um anticorpo adequado, ou fragmento deste (por exemplo, por clonagem baseada em hibridização, PCR, síntese peptídica, e

10 semelhantes), e para a construção moléculas de ligação multivalentes com a utilização destes compostos. Fontes de anticorpos exemplares dos quais os domínios de ligação foram obtidos, como aqui descrito, são fornecidos na Tabela 6. Tipicamente, será usada uma estratégia de clonagem ou de

15 síntese que realiza as regiões CDR de uma cadeia de anticorpo, embora qualquer anticorpo, fragmento deste ou derivado deste que retenha a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno-alvo seja contemplada.

Definida com mais detalhe, a clonagem de regiões

20 variáveis da cadeia pesada e/ou leve de anticorpos por hibridomas é padrão na técnica. Não há necessidade de que a seqüência da região variável de interesse seja conhecida a fim de obter aquela região com o uso de técnicas convencionais de clonagem. Veja, por exemplo, Gilliland e

25 cols., *Tissue Antigens* 47(1): 1-20 (1996). Para preparar polipeptídeos de cadeia simples que compreendem uma região variável que reconhece um antígeno de leucócito muríneo ou humano, foi derivado um método para a clonagem e expressão rápidas que gerasse uma proteína funcional em até duas a

30 três semanas do isolamento de RNA de células de hibridoma.

As regiões variáveis foram clonadas *Poe poli-G tailing* do cDNA de primeira fita, seguido por PCT de ancoragem com um iniciador de ancoragem poli-C a diante e um iniciador específico reverso para a sequência da região constante.

5 Ambos os iniciadores contêm sítios flanqueadores de endonuclease de restrição para inserção em pUC19. Foram gerados conjuntos de iniciadores de PCR para isolamento de genes de V_L e V_H muríneas, de hamster e de rato. Após determinação de sequências de consenso para um par

10 específico de V_L e V_H , os genes de V_L e V_H foram ligados por um DNA que codifica um ligante peptídico interveniente (tipicamente que codifica $(Gly_4Ser)_3$) e os cassetes do gene V_L -ligante- V_H foram transferidos no vetor de expressão mamífero pCDM8. As construções foram transfectadas em

15 células COS e os sFvs foram recuperados do sobrenadante do meio de cultura condicionado. Esse método foi usado com sucesso para gerar sFv funcional para CD2, CD3, CD4, CD8, CD28, CD40, CD45 humanos e CD3 e gp39 muríneas, de hibridomas que produzem anticorpos muríneos, de rato ou

20 hamster. Inicialmente, os sFvs foram expressos como proteínas de fusão com os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG1 humana para facilitar a caracterização e purificação rápidas com o uso de reagentes anti-IgG humana de cabra ou proteína A. sFv ativo também podia ser expresso com um

25 pequeno peptídeo, por exemplo, um tag, ou em uma forma sem *tail*. A expressão de formas sem *tail* de CD3 (G19-4)sFv demonstrou atividade de sinalização celular aumentada e revelou que sFvs possuem potencial para receptores de ativação.

30 Alternativamente, a identificação da sequência de

aminoácidos primária dos domínios variáveis de anticorpos monoclonais pode ser obtida diretamente, por exemplo, por proteólise limitada do anticorpo, seguida por seqüenciamento do peptídeo do terminal N usando, por exemplo, o método de degradação de Edman ou por espectroscopia de massa por fragmentação. Métodos de seqüenciamento do terminal N são bem conhecidos na técnica. Após a determinação da seqüência de aminoácidos primária, os domínios variáveis, é montado um cDNA que codifica essa seqüência por métodos de síntese de ácido nucléico sintético (por exemplo, PCR), seguidos por geração de scFv. Os métodos necessários ou preferidos de manipulação de ácido nucléico são padronizados na técnica.

Fragmentos, derivados e análogos de anticorpos, como descrito acima, também são contemplados como domínios de ligação adequados. Além disso, qualquer uma das sub-regiões constantes descritas acima é contemplada, incluindo sub-regiões constantes que compreendem qualquer uma das regiões de dobradiça descritas acima. Adicionalmente, as moléculas multivalentes de cadeia simples de ligação descritas nesse exemplo podem incluir qualquer um ou todos os ligantes aqui descritos.

Os anticorpos monoclonais foram inicialmente expostos às células e depois entrecruzados com o uso de um anticorpo de segunda-etapa anticomumonguês de cabra (2ª etapa). Opcionalmente, é possível entrecruzar os anticorpos, antes do contato das células com os anticorpos, por exemplo, por entrecruzamento dos anticorpos em solução. Como outra alternativa, os anticorpos monoclonais poderiam ser entrecruzados em uma fase sólida por adsorção sobre o fundo

plástico de poços de cultura de tecido, ou "capturados" nesse plástico por meio de anticorpo de cabra anticomundongo adsorvido ao plástico, seguido por ensaios baseados em placas para avaliar, por exemplo, a interrupção
5 do crescimento ou a viabilidade celular.

A inversão de fosfatidilserina do lado citosólico da membrana celular para a superfície celular exterior daquela membrana plasmática é um indicador aceito de eventos pró-apoptóticos. A progressão até a apoptose leva à perda da
10 integridade da membrana celular, o que pode ser detectado pela entrada de um corante de intercalação impermeável à célula, por exemplo, iodeto de propídio (PI). Após exposição da célula aos anticorpos monoclonais, isoladamente ou em combinação, a dual, foi realizado um
15 ensaio pró-apoptótico, e populações de células tratadas foram classificadas quanto à inclusão positiva na superfície celular de anexina V (ANN) e/ou PI.

Análise da ligação de Anexina V/internalização de iodeto de propídio

20 *Células e condições de cultura de células.* Foram feitos experimentos para examinar o efeito do entrecruzamento de dois anticorpos monoclonais diferentes contra alvos expressos em quatro linhagens de células B humanas. Os efeitos sobre as linhagens celulares foram
25 medidos por determinação dos níveis de coloração com ANN e/ou PI após exposição. As linhagens de células B humanas BJAB, Ramos (ATCC # CRL-1596), Daudi (ATCC # CCL-213) e DHL-4 (DSMZ # ACC495) foram incubadas por 24 horas a 37°C em CO₂ 5% em meio completo com Iscoves (Gibco) FBS 10%. As
30 células foram mantidas em uma densidade entre 2-8 x 10⁵

células/ml, e uma viabilidade tipicamente >95%, antes do estudo.

Os experimentos foram feitos em uma densidade celular de 2×10^5 células/ml, e com 2 µg/ml de cada anticorpo monoclonal comparativo de uma matriz contra antígenos de célula B. Cada anticorpo monoclonal comparador foi adicionado a 2 µg/ml, isolada ou individualmente, quando combinado com cada anticorpo monoclonal da matriz, também a 2 µg/ml. A Tabela 6 lista o número de catálogo e as fontes de anticorpos monoclonais usados nesses experimentos. Para o entrecruzamento desses anticorpos monoclonais em solução, IgG anticomundongo de cabra (Jackson Labs N° de catálogo 115-001-008) foi adicionada a cada poço em uma proporção de concentração de 2:1 (anticomundongo de cabra:cada anticorpo monoclonal), por exemplo, um poço com apenas um anticorpo monoclonal a 2 µg/ml teria anticomundongo de cabra adicionado até uma concentração final de 4 µg/ml, enquanto poços com tanto com anticorpo monoclonal comparador (2 µg/ml) quanto um anticorpo monoclonal da matriz (2 µg/ml) teriam 8 µg/ml de anticorpo anticomundongo de cabra adicionados ao poço.

Após 24 horas de incubação a 37°C em CO₂ 5%, as células foram coradas com Anexina V-FITC e iodeto de propídio usando o Kit de Detecção de Apoptose Anexina V-FITC I BD Pharmingen (#556547). Resumidamente, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado, e ressuspensas em "tampão de ligação" a 1×10^6 células/ml. Cem microlitros das células em tampão de ligação foram então corados com 5 µl de Anexina V-FITC e 5 µl de iodeto de propídio. As células foram gentilmente misturadas e incubadas no escuro

em temperatura ambiente por 15 minutos. Quatrocentos microlitros de tampão de ligação foram então adicionados a cada amostra. As amostras foram então lidas em um FACsCalibur (Becton Dickinson) e analisadas com o uso do software CellQuest (Becton Dickinson).

Tabela 6

Nome	Número de catálogo	Fornecedor comercial
Anti-CD19	#C2269-74	US Biological (Swampscott, MA)
Anti-CD20	#169-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD21	#170-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD22	#171-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD23	#172-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD30	#179-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD37	#186-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD40	#300-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD70	#222-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD72	#C2428-41B1	US Biological (Swampscott, MA)
Anti-CD79a	#235-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD79b	#301-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD80	#110-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD81	#302-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CD86	#307-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)
Anti-CL II DR, DQ, DP	#131-820	Ancell Corp. (Bayport, MN)

Tabela 6. Anticorpos contra antígenos de célula B usados nesse estudo e suas fontes.

A adição do anticorpo de entrecruzamento (por exemplo,

anticorpo anticamundongo de cabra) ao anticorpo monoclonal A isoladamente resultou em sensibilidade celular aumentada, sugerindo que uma molécula de ligação multivalente, ou *scorpion*, construída com dois domínios de ligação que reconhecem o mesmo antígeno seria eficaz no aumento da sensibilidade celular. Sem se prender a uma teoria, essa sensibilidade aumentada poderia ser causada por agrupamento de antígeno e sinalização alterada. Os membros da família dos receptores de TNF, por exemplo, necessitam da homomultimerização para a transdução de sinal, e *scorpions* com domínios de ligação equivalentes em cada extremidade da molécula poderiam facilitar essa interação. O agrupamento e subsequente sinalização por CD40 é um exemplo desse fenômeno no sistema de células B.

Como mostrado nas Figuras 20, 21 e 22, a adição do anticorpo monoclonal A e anticorpo monoclonal B contra diferentes antígenos produzirá efeitos pró-apoptóticos aditivos ou, em algumas combinações, mais do que aditivos (ou seja, sinérgicos) sobre as células tratadas. Na Figura 20, por exemplo, a combinação de anti-CD20 com anticorpos monoclonais contra outros antígenos de célula B resultou, em graus variáveis, em sensibilidade celular aumentada. Algumas combinações, por exemplo, anti-CD20 combinado com anti-CD19 ou anti-CD20 combinado com anti-CD21, no entanto, produziram efeitos pró-apoptóticos mais do que aditivos, indicando que as moléculas de ligação multivalentes ou *scorpions* compostos por esses domínios de ligação devem ser particularmente eficazes na eliminação de células B transformadas. Em relação à Figura 20, a percentagem de células que exibem atividades pró-apoptóticas quando

expostas ao anticorpo anti-CD 20 isoladamente é de cerca de 33% (barra com listras verticais que correspondem a "20", ou seja, o anticorpo anti-CD20); a percentagem de células pró-apoptóticas mediante exposição ao anticorpo anti-CD19 é de cerca de 12% (barra com listras verticais na Fig. 20 que corresponde a "19", ou seja, o anticorpo anti-CD19); e a percentagem de células pró-apoptóticas mediante exposição a ambos os anticorpos, anti-CD20 e anti-CD19, é de cerca de 73% (barra com listras horizontais na Fig. 20 que corresponde a "19"). Os 73% de células pró-apoptóticas após exposição a ambos anticorpos são significativamente maiores do que os 45% (33% + 12%) referentes à soma dos efeitos atribuíveis a cada anticorpo individual, indicando um efeito sinérgico atribuível ao par de anticorpos anti-CD19 e anti-CD 20. As moléculas de ligação multivalentes úteis incluem moléculas nas quais os dois domínios de ligação levam a um efeito aditivo sobre o comportamento de células B, bem como as moléculas de ligação multivalentes nas quais os dois domínios de ligação levam a efeitos sinérgicos sobre o comportamento de células B. Em algumas modalidades, um domínio de ligação não terá efeitos detectáveis sobre o parâmetro medido do comportamento de célula, com cada um dos domínios de ligação pareados contribuindo para aspectos distintos das atividades da molécula de ligação multivalente, por exemplo, uma molécula de ligação multivalente e multiespecífica (por exemplo, domínio de ligação A se liga a uma célula-alvo e promove apoptose, enquanto o domínio de ligação B se liga a uma substância terapêutica solúvel, por exemplo, uma citotoxina). Dependendo do design de uma molécula de ligação

multivalente, a questão relacionada ao tipo de efeito combinado (aditivo, sinérgico ou inibidor) dos dois domínios de ligação sobre uma célula-alvo pode não ser relevante, pois um dos domínios de ligação é específico para um parceiro de ligação não celular (por exemplo, solúvel) ou é específico para um parceiro de ligação associado a uma célula, mas em um tipo de célula diferente.

Pareamentos exemplares de domínios de ligação que produzem efeitos aditivos, sinérgicos ou inibidores, como mostrado nas Figuras 20-23, ficam evidentes a partir das Tabelas 7 e 8.

A Tabela 7 fornece dados quantitativos extraídos de cada uma das Figuras 20-23 em termos da percentagem de células que coram positivas para ANN e/ou PI. A Tabela 8 fornece cálculos que utilizam os dados da Tabela 7 que fornecem uma base para determinar se a interação de certo par de anticorpos gerou um efeito aditivo, sinérgico ou inibidor, novamente, como avaliado pela percentagem de células que coram positivas para ANN e/ou PI.

20 **Tabela 7**

Name	Anti-CD20	Anti-CD79b	Anti-CL II	Anti-CD22
Anti-CD19	13/73*	18/76/66	14/47/46	12/11
Anti-CD20	33/NA	42/94/92	33/71/76	28/33
Anti-CD21	14/75	22/50/76	18/24/40	11/11
Anti-CD22	8/55	12/39/33	12/19/17	10/12
Anti-CD23	8/41	12/63/55	14/22/17	10/12
Anti-CD30	8/38	14/72/61	12/56/61	10/11
Anti-CD37	15/45	19/92/86	20/60/62	19/20
Anti-CD40	10/48	12/44/30	13/21/28	14/13
Anti-CD70	9/40	12/56/39	15/21/15	10/10

Anti-CD72	ND	16/60/64	30/78/63	17/17
Anti-CD79a	21/66	43/42/50	28/55/51	14/14
Anti-CD79b	46/88	70/70/68	45/80/76	26/16
Anti-CD80	7/41	14/35/30	15/19/17	11/11
Anti-CD81	14/65	25/86/83	25/54/43	19/20
Anti-CD86	7/38	16/58/42	15/24/18	14/11
Anti-CL II	53/77	52/96/98	47/52/43	72/57

* Nas colunas 2-4 da Tabela 7, os valores numéricos refletem as alturas das barras do histograma nas Figuras 20-22, respectivamente, com o primeiro número em cada célula representando a altura de uma barra com listras verticais, o segundo número representando a altura de uma barra com listras horizontais e, quando presente, o terceiro número refletindo a altura de uma barra pontilhada. Na coluna 5, o primeiro número reflete a altura de uma barra sólida, e o segundo número reflete a altura de uma barra com listras inclinadas na Figura 23.

Tabela 8

Nome	Anti-CD20	Anti-CD79b	Anti-CL II	Anti-CD22
Anti-CD19	S: 13+33=46*	A: 18+56=74 A: 18+43=61	S: 14+26=40 S: 14+18=32	I: 12+10=22
Anti-CD20	ND	A: 42+56=98 A: 42+43=85	S: 33+26=59 S: 33+18=51	A/I: 28+10=38
Anti-CD21	S: 14+33=47	I: 22+56=78 S: 22+43=65	I: 18+26=44 A: 18+18=36	I: 11+10=21
Anti-CD22	S: 8+33=41	I: 12+56=68 I: 12+43=55	I: 12+26=38 I: 12+18=30	ND
Anti-CD23	A: 8+33=41	A: 12+56=68 A: 12+43=55	I: 14+26=40 I: 14+18=32	I: 10+10=20
Anti-CD30	A: 8+33=41	A: 14+56=70	S: 12+26=38	I: 10+10=20

Nome	Anti-CD20	Anti-CD79b	Anti-CL II	Anti-CD22
		A: 14+43=57	S: 12+18=30	
Anti-CD37	A: 15+33=48	S: 19+56=75 S: 19+43=62	S: 20+26=46 S: 20+18=38	I: 19+10=29
Anti-CD40	A/S:10+33=43	I: 12+56=68 I: 12+43=55	I: 13+26=39 A: 13+18=31	I: 14+10=24
Anti-CD70	A: 9+33=42	I: 12+56=68 I: 12+43=55	I: 15+26=41 I: 15+18=33	I: 10+10=20
Anti-CD72	ND	I: 16+56=72 A: 16+43=59	S: 30+26=56 S: 30+18=48	I: 17+10=27
Anti-CD79a	S: 21+33=54	I: 43+56=99 I: 43+43=86	A: 28+26=54 A: 28+18=46	I: 14+10=24
Anti-CD79b	S: 46+33=79	ND	S: 45+26=71 S: 45+18=63	I: 26+10=36
Anti-CD80	A: 7+33=40	I: 14+56=70 I: 14+43=57	I: 15+26=41 I: 15+18=33	I: 11+10=21
Anti-CD81	S: 14+33=47	A: 25+56=81 S: 25+43=68	A: 25+26=51 A: 25+18=43	I: 19+10=29
Anti-CD86	A: 7+33=40	I: 16+56=72 I: 16+43=59	I: 15+26=41 I: 15+18=33	I: 14+11=25
Anti-CL III	I:53+33=86	A:52+56=108 A: 52+43=95	ND	I: 72+10=82

"A" significa que um efeito "aditivo" foi observado

"S" significa que um efeito "sinérgico" foi observado

"I" significa que um efeito "inibidor" foi observado

* Equação esquemática: A+B=C, em que "A" é o percentual de células positivas para ANN e/ou PI em função do anticorpo da matriz isoladamente, "B" é o percentual de células positivas para ANN e/ou PI em função do anticorpo comum (anti-CD20 para a Fig. 20, anti-CD79b para a Fig. 21, anti-

CLII para a Fig. 22 e anti-CD22 para a Fig. 23), e "C" é o efeito aditivo esperado (veja a Tabela 7, acima, para os dados quantitativos que correspondem às Figuras 20-23). Quando duas equações estiverem presentes em uma célula, a equação superior reflete os resultados do uso da maior concentração indicada de anticorpo comum; a equação inferior reflete uso da menor concentração indicada de anticorpo comum.

Em algumas modalidades, os dois domínios de ligação interagem de uma forma inibidora, aditiva ou sinérgica na sensibilização (ou dessensibilização) de uma célula-alvo como, por exemplo, uma célula B. a Figura 23 mostra os efeitos protetores, ou inibidores, resultantes da combinação do anticorpo anti-CD22 com anticorpos monoclonais fortemente pró-apoptóticos como, por exemplo, o anticorpo anti-CD79b ou anticorpo anti-classe II do MHC (ou seja, anti-CL II). Por exemplo, a Figura 23 e a Tabela 7 mostram que o anticorpo anti-CD22 isoladamente não induz mais do que cerca de 10% de células exibam comportamento pró-apoptótico (barra sólida que corresponde a "22" na Fig. 23) e anti-CD79b induz cerca de 26% de células pró-apoptóticas (barra sólida que corresponde a "CD79b" na Fig. 23). Em combinação, no entanto, anti-CD22 e anti-CD79b induzem apenas cerca de 16% de células pró-apoptóticas (barra com listras inclinadas que corresponde a "79b" na Fig. 23). Dessa forma, os anticorpos combinados induzem 16% de células pró-apoptóticas, o que é menos do que 38% da soma dos efeitos individuais atribuíveis ao anti-CD22 (12%) e anti-CD79b (26%). Com a utilização dessa abordagem, uma inspeção da Figura 23 e/ou das Tabelas 7-8 revela que o

anticorpo anti-CD22 e, por extensão, uma molécula de ligação multivalente e multiespecífica que compreende um domínio de ligação anti-CD22, quando usada em combinação separada com cada um dos seguintes anticorpos (ou domínios de ligação correspondentes): anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21, anti-CD23, anti-CD30, anti-CD37, anti-CD40, anti-CD70, anti-CD72, anti-CD79a, anti-CD79b, anti-CD80, anti-CD81, anti-CD86 e anticorpos/domínios de ligação anti-classe II do MHC, produzirão um efeito global inibido.

Sem se prender a uma teoria, os dados podem ser interpretados como uma indicação de que o anticorpo anti-CD22, ou uma molécula de ligação multivalente e multiespecífica que compreende um domínio de ligação anti-CD22, protegerá contra, ou atenuará um efeito de, qualquer um dos anticorpos listados imediatamente acima. De forma mais geral, uma molécula de ligação multivalente e multiespecífica que compreende um domínio de ligação anti-CD22 inibirá o efeito que surge da interação com qualquer um de CD19, CD20, CD21, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86, e moléculas de MHC da classe II. Pode ser observado na Figura 23 e na Tabela 8 que o anticorpo anti-CD22 e, por extensão, um domínio de ligação que compreende um domínio de ligação anti-CD22, funcionará como um inibidor ou atenuador da atividade de qualquer anticorpo/domínio de ligação que reconheça um marcador da superfície de células B como, por exemplo, um antígeno CD. Espera-se que moléculas de ligação multivalentes, incluindo moléculas de ligação multivalentes e multiespecíficas, sejam úteis no refinamento de regimes de tratamento para diversas doenças nas quais a atividade

de um domínio de ligação precisa ser atenuada ou controlada.

Além do efeito inibidor, aditivo ou sinérgico combinado de dois domínios de ligação que interagem com uma
5 célula-alvo, tipicamente por meio da ligação de ligantes da superfície da célula, os resultados experimentais aqui revelados estabelecem que certo par de domínios de ligação pode fornecer um tipo diferente de efeito combinado, dependendo das concentrações relativas dos dois domínios de
10 ligação aumentando, dessa forma, a versatilidade da invenção. Por exemplo, a Tabela 8 revela que anti-CD21 e anti-CD79b interagem de uma forma inibidora na maior concentração testada de anti-CD79b, mas esses dois anticorpos interagem de forma sinérgica na menor
15 concentração testada de anti-CD79b. Embora algumas modalidades utilizarão um único tipo de molécula de ligação multivalente, ou seja, uma molécula de ligação multivalente monoespecífica que compreende, por exemplo, um único domínio de ligação de CD21 e um único domínio de ligação de
20 CD79b, a invenção compreende misturas de moléculas de ligação multivalentes que permitirão ajustes das concentrações relativas de domínio de ligação para se obter um efeito desejado como, por exemplo, um efeito inibidor, aditivo ou sinérgico. Além disso, os métodos da invenção
25 englobam o uso de uma única molécula de ligação multivalente em combinação com outra molécula de ligação, por exemplo, uma molécula de anticorpo convencional, para ajustar ou otimizar as concentrações relativas de domínios de ligação. Aquelles habilitados na técnica serão capazes de
30 determinar concentrações relativas úteis de domínios de

ligação com a utilização de técnicas padronizadas (por exemplo, por projeto de matrizes experimentais de duas séries de diluição, uma para cada domínio de ligação).

Sem se prender a uma teoria, reconhece-se que a
5 ligação de um ligante pode induzir ou modular a aparência da superfície de um segundo ligante no mesmo tipo de célula, ou ela pode alterar o contexto da superfície do segundo ligante, de modo a alterar sua sensibilidade à ligação por uma molécula de ligação específica, por
10 exemplo, um anticorpo ou uma molécula de ligação multivalente.

Embora tenham sido aqui exemplificados com o uso de linhagens e antígenos de células B, esses métodos podem determinar otimamente moléculas de ligação multivalentes
15 (ou seja, *scorpions*) que sejam aplicáveis a outros quadros de doença e populações de célula-alvo, incluindo outras células normais, seus equivalentes celulares aberrantes, incluindo células hematopoiéticas estimuladas cronicamente, células de carcinoma e células infectadas.

20 Outros fenótipos de sinalização, por exemplo, mobilização de Ca^{2+} ; tirosina fosfo-regulação; ativação de caspase; ativação de NF- κ B; citocina, elaboração de fator de crescimento ou quimiocina; ou expressão gênica (por exemplo, em sistemas repórteres) também podem ser usados em
25 métodos de rastreamento quanto aos efeitos diretos de combinações anticorpo monoclonal.

Como alternativa ao uso de um anticorpo secundário para entrecruzar os anticorpos primários e mimetizar a estrutura da molécula de ligação multivalente ou *scorpion*,
30 outras moléculas que se ligam à porção Fc de anticorpos,

incluindo receptores Fc solúveis, proteína A, componentes do complemento, incluindo C1q, lectina de ligação de manose, glóbulos ou matrizes contendo agentes reativos ou de entrecruzamento, agentes químicos bifuncionais de
 5 entrecruzamento e adsorção ao plástico, poderiam ser usadas para entrecruzar múltiplos anticorpos monoclonais contra o mesmo antígeno ou contra antígenos diferentes.

Exemplo 12

Proteína de ligação multivalente com função efetora ou
 10 *scorpion*, estruturas

A estrutura esquemática geral de um polipeptídeo *scorpion* é H2N-domínio de ligação 1-ligante *scorpion*-sub-região constante-domínio de ligação 2. *Scorpions* também podem ter uma região de dobradiça-like, tipicamente uma
 15 região do peptídeo derivada de uma dobradiça de anticorpo, disposta no terminal N em relação ao domínio de ligação 1. Em algumas modalidades de *scorpion*, o domínio de ligação 1 e o domínio de ligação 2 são derivados de um domínio de ligação de imunoglobulina, por exemplo, derivados de uma V_L
 20 e uma V_H. A V_L e a V_H são tipicamente unidas por um ligante. Foram eitos experimentos para demonstrar que polipeptídeos *scorpion* podem ter domínios de ligação que diferem de um domínio de ligação de imunoglobulina, incluindo um domínio de ligação de Ig do qual o domínio de ligação *scorpion* foi
 25 derivado, por diferenças de seqüências de aminoácidos que resultam em uma divergência de seqüências de tipicamente menos do que 5% e, de preferência, menos do que 1%, em relação ao domínio de ligação de Ig-fonte.

Freqüentemente, as diferenças de seqüências resultam
 30 em mudanças de aminoácidos únicas com, por exemplo,

substituições. Uma localização preferida para estas mudanças de aminoácidos é em uma ou mais regiões de um domínio de ligação *scorpion* que correspondem, ou exibem pelo menos 80% e, de preferência, 85% ou 90%, de identidade de sequência para uma região determinante de complementaridade (CDR) de Ig de um domínio de ligação de Ig do qual o domínio de ligação *scorpion* foi derivado. Mais orientações são fornecidas por comparação de modelos de peptídeos que se ligam ao mesmo alvo, por exemplo, CD20.

Com relação ao CD20, o mapeamento de epitopos revelou que o anticorpo 2H7, que se liga ao CD20, reconhece o motivo Ala-Asn-Pro-Ser (ANPS) de CD20, e espera-se que *scorpions* de ligação de CD20 também reconhecerão esse motivo. Prevê-se que alterações na sequência de aminoácidos que fazem com que o motivo ANPS seja profundamente embutido em uma bolsa formada de regiões do domínio de ligação *scorpion* que correspondem às CDRs de Ig sejam ligantes funcionais de CD20. Estudos de modelagem também revelaram que regiões do *scorpion* que correspondem à CDR3 (V_L), CDR1-3 (V_H) entram em contato com CD20, e espera-se que alterações que mantêm ou facilitam esses contatos gerem *scorpions* que se ligam ao CD20.

Além de facilitar a interação de um *scorpion* com seu alvo, são contempladas alterações nas sequências de domínios de ligação *scorpion* (em relação às sequências cognatas do domínio de ligação de Ig) que promovem a interação entre regiões do domínio de ligação *scorpion* que correspondem aos domínios V_L e V_H de Ig. Por exemplo, em uma região do *scorpion* de ligação de CD20 que corresponde à V_L , a sequência SYIV pode ser alterada por substituição de

um aminoácido para Val (V33), por exemplo, His, resultando na sequência SYIH. Espera-se que essa alteração acentue a interação entre regiões do *scorpion* que correspondem aos domínios V_L e V_H . Além disso, espera-se que a adição de um
5 resíduo no terminal N de uma região do *scorpion* que corresponde à V_H -CDR3 irá alterar a orientação daquela região do *scorpion*, afetando provavelmente suas características de ligação, porque a Ser do terminal N de V_H -CDR3 faz contato com CD20. Ensaio de rotina revelará
10 aquelas orientações que produzem alterações desejáveis nas características de ligação. Contempla-se também que mutações em regiões do *scorpion* que correspondem à V_H -CDR2 e/ou V_H -CDR3 criarão novos contatos potenciais com um alvo, por exemplo, CD20. Por exemplo, com base nos estudos de
15 modelagem, espera-se que substituições de Y105 e W106 (encontrados na sequência NSYW) em uma região que corresponde à V_H -CDR3 alterarão as características de ligação de um *scorpion* de uma forma que possa ser usado um ensaio de rotina para a identificação de *scorpions* com
20 características de ligação modificadas. Como exemplo adicional, espera-se que uma alteração na sequência de um domínio de ligação *scorpion* que corresponde a uma V_L -CDR3 de Ig, por exemplo, o Trp (W) na sequência CQQW, irá afetar a ligação. Tipicamente, alterações em uma região do
25 *scorpion* que corresponde a uma CDR de Ig serão rastreadas por aqueles *scorpions* que exibem um aumento da afinidade pelo alvo.

Com base na estrutura-modelo do domínio de ligação de scFv de CD20 humanizado 20-4, nas informações publicadas em
30 relação à estrutura da alça extracelular de CD20 (Du, e

cols., *J. Biol. Chem.* 282(20): 15.073-80 (2007)) e no epitopo de ligação de CD20 reconhecido pelo anticorpo 2H7 de camundongo (que foi a fonte de CDRs para o domínio de ligação de scFv humanizado 20-4), foram projetadas mutações nas regiões CDR do *scorpion* 2Lm20-4x2Lm20-4 com o objetivo de aumentar a afinidade de sua ligação ao CD20. Primeiro, as mutações foram projetadas para influenciar a conformação da CDR de 20-4 e promover a ligação mais eficiente à alça extracelular de CD20. Segundo, as alterações introduzidas foram projetadas para fornecer novas interações intermoleculares entre o *scorpion* 2Lm20-4x2Lm20-4 e seu alvo. Essas mutações incluem: V_L CDR1 V33H, ou seja, uma substituição de His para Val na posição 33 da CDR1 na região VL), VL CDR3 W90Y, VH CDR2 D57E, VH CDR3 inserção de V após o resíduo S99, VH CDR3 Y101K, VH CDR3 N103G, VH CDR3 N104G e VH CDR3 Y105D. Em função dos efeitos sinérgicos esperados da combinação de algumas dessas mutações, foram projetados 11 mutantes, que combinam diferentes mutações, como mostrado na Tabela 9 (resíduos introduzidos por mutação estão em negrito e sublinhados).

Tabela 9

V _L CDR1	V _L CDR3	V _H CDR2	V _H CDR3
RASSSVSYIH	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	<u>SV</u> YYSNYWFIDL
RASSSVSYIH	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	<u>SV</u> YY <u>GG</u> YWFIDL
RASSSVSYIH	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	SYYSNS <u>D</u> WFIDL
RASSSVSYIH	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	SYYS <u>GGD</u> WFIDL
RASSSVSYIV	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	SY <u>K</u> NSYWFIDL
RASSSVSYIV	QQWSFNPPT	AIYPGNG <u>E</u> TSYNQKFKG	SYYSNSYWFIDL
RASSSVSYIV	<u>QQY</u> SFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	SYYSNSYWFIDL

5

10 Foram introduzidas mutações nos domínios de ligação do
 scorpion CD20xCD20 (2Lm20-4x2Lm20-4) por mutagênese por PCR
 usando os iniciadores que codificam a região da sequência
 alterada. Após confirmação da sequência, fragmentos de DNA
 que codificam os fragmentos scFv de 2Lm20-4 com mutações
15 correspondentes foram clonados em um vetor de expressão
 convencional contendo uma região codificadora para a sub-
 região constante de um *scorpion*, resultando em um
 polinucleotídeo contendo a sequência de DNA completa de
 novas versões do *scorpion* 2Lm20-4x2Lm20-4. As variantes do
20 *scorpion* 2Lm20-4x2Lm20-4 com mutações de CDR foram
 produzidas por expressão em um sistema transitório de
 células COS e purificadas por meio de cromatografia com
 Proteína A e exclusão de tamanho (SEC). As propriedades de
 ligação das variantes do *scorpion* 2Lm20-4x2Lm20-4 foram
25 avaliadas por análise FACS com o uso de células B primárias
 e as linhagem de células B de linfoma WIL2-S.

 Também foram gerados outros mutantes usando uma
 abordagem similar para otimizar domínios de ligação de
 CD20. O SMIP de CD20 designado TRU015 serviu como substrato
30 para a geração de mutantes e, a menos que observado de

forma diferente, todos os domínios eram domínios humanos. Verificou-se que os seguintes mutantes contêm domínios de ligação de CD20 úteis e funcionais. A molécula 018008 continha uma substituição de Q (código de aminoácidos com
5 uma letra) para S na posição 27 da CDR1 em VL, uma substituição de S para T na posição 28 na CDR1 de VH e uma substituição de L para V na posição 102 na CDR3 de VH. As seguintes seqüências parciais do ligante *scorpion*, que correspondem à seqüência CCCP em um dobradiça de IgG1,
10 foram combinadas separadamente com as VL e VH mutadas: CSCS, SCCS e SCCP, consistentes com o design modular de *scorpions*. A molécula 018009 continha uma substituição de Q para S na posição 27 de CDR1 de VL, uma substituição de S para T na posição 28 de CDR1 de VH e substituições de S
15 para V na posição 96, L para V na posição 102 e eliminação do V na posição 95, todas em CDR3 de VH. As mesma subseqüências do ligante *scorpion* descritas acima como sendo encontradas nos ligantees *scorpion* usados em 018008 foram usadas em 018009. A molécula 018010 continha
20 substituições de um Q para S na posição 27, um I para M na posição 33 e um V para H na posição 34, todas em CDR1 de VL, juntamente com uma substituição S para T na posição 28 de CDR1 de VH e uma substituição de L para V na posição 102 na CDR3 de VH. Os ligantees *scorpion* definidos pelas
25 subseqüências CSCS e SCCS foram usados com 018010. 018011 continha as mesmas mutações na CDR1 de VL e na CDR1 de VH descritas para 018010, juntamente com a eliminação de V na posição 95, substituição de S para V na posição 96 e substituição de L para V na posição 102, todas em CDR3 de
30 VH. Os ligantees *scorpion* definidos pelas subseqüências

CSCS, SCCS e SCCP foram usados em moléculas 018011. A VL de 018014 era uma VL de camundongo não mutada, com uma VH humana contendo a alteração de S para T em 28 na CDR1, e alteração de L para V em 102 na CDR3. 018015 também
5 continha uma VL de camundongo não mutada, juntamente com uma VH humana contendo uma alteração de S para T em 28 de CDR1 e, na CDR3, uma eliminação de V em 95, substituição de S para V em 96, e substituição de L para V em 102. A molécula 2Lm5 tinha uma alteração de Q para S em 27 na CDR1
10 de VL, um F para Y em 27 e uma S para T em 30, ambas na CDR1 de VH, além da eliminação do V em 95, S para V em 96 e L para V em 102, todas em CDR3 de VH. Os ligantes *scorpion* definidos pelas subsequências CSCS, SCCS e SCCP foram usados separadamente em cada uma de 018014 e 018015. 2Lm5-1
15 era igual ao 2Lm5, exceto que 2Lm5-1 não tinha mutações na CDR1 de VH, e somente um ligante *scorpion* definido pela subsequência CSSS foi usado. 2Lm6-1 tinha as mutações de 2Lm5 e uma substituição de T para S em 92 e S para F em 93 na CDR3 de VL, e somente o ligante *scorpion* definido pela
20 subsequência CSSS foi usado. As únicas mutações em 2Lm16 foram as mutações na CDR3 de VH listadas acima para 2Lm5-1. Os ligantes *scorpion* definidos pelas subsequências CSCS, SCCS e SCCP foram usados separadamente em 2Lm16. 2Lm16-1 substituiu Q para S em 27 na CDR1 de VL e substituiu T para
25 S em 92, e S para F em 93, ambas na CDR3 de VL e, na CDR3 de VH, eliminou V em 95, substituiu S para V em 96 e substituiu L para V em 102; somente o ligante *scorpion* definido pela subsequência CSSS foi usado. 2Lm19-3 substituiu Q para S em 27, I para M em 33 e V para H em 34,
30 todas em CDR1 de VL, juntamente com as mutações na CDR3 de

VH listadas para 2Lm16-1. Os ligantees *scorpion* definidos pelas subsequências CSCS, SCCS e SCCP foram usados separadamente em 2Lm19-3. A molécula 2Lm20-4 continha uma substituição de I para M em 33 e um V para H em 34, ambas

5 na CDR1 de VL, juntamente com as mutações na CDR3 de VH listadas para 2Lm16-1. Para 2Lm5-1, 2Lm6-1, 2Lm16, 2Lm16-1, 2Lm19-3 e 2Lm20-4, também houve uma substituição de S para L na posição 11 na região estrutural de VH. Os ligantees *scorpion* definidos pelas subsequências CSCS, SCCS e SCCP

10 foram usados separadamente em 2Lm20-4. Finalmente, a substituição de S para P na posição 331 estava presente nos seguintes mutantes: 018008 com o ligante *scorpion* definido por CSCS, 018009 com cada um dos ligantees *scorpion* definido por CSCS e SCCP, 018010 com o ligante *scorpion*

15 definido por CSCS, 018011 com o ligante *scorpion* definido por SCCP, 018014 com o ligante *scorpion* definido por CSCS, 018015 com o ligante *scorpion* definido por CSCS, 2Lm16 com ligantees *scorpion* definidos por qualquer um de CSCS, SCCS e SCCP; 2Lm19-3 com um ligante *scorpion* definido por CSCS

20 ou SCCP e 2Lm20-4 com um ligante *scorpion* definido por CSCS ou SCCP.

Além disso, são contempladas alterações no comprimento de um ligante que unem duas regiões de um domínio de ligação, por exemplo, as regiões de um domínio de ligação

25 *scorpion* que correspondem a uma V_L e V_H de Ig. Por exemplo, espera-se que a remoção de um Asp do terminal C em ligantees interdomínios nos quais é encontrado afete as características de ligação de um *scorpion*, já que é uma substituição de Gly para Asp.

30 Também são contemplados *scorpions* que possuem um

ligante *scorpion* (interposto no terminal C em relação à sub-região constante e no terminal N em relação ao domínio de ligação 2) que seja alongado em relação a uma região de dobradiça de uma Ig, com resíduos de aminoácidos sendo
5 adicionados no terminal C em relação a qualquer cisteína no *scorpion* que corresponda a uma cisteína da dobradiça de Ig, com a cisteína do *scorpion* sendo capaz de formar uma ligação dissulfeto intercadeias. Foram construídos e são caracterizados abaixo *scorpions* que contêm essas
10 características.

Foram feitos esforços para aumentar a expressão, a estabilidade e a potência terapêutica de *scorpions* por meio da otimização do ligante *scorpion* que une covalentemente uma sub-região constante e o domínio de ligação 2 disposto
15 no terminal C. O *scorpion* prototípico usado para estudos de otimização continha um scFV anti-CD20 (domínio de ligação 1) fundido no terminal N em relação à sub-região constante derivada da C_{H2} e C_{H3} de IgG1, com um segundo scFv anti-CD20 fundido no terminal C em relação àquela sub-região
20 constante. Espera-se que esse *scorpion*, como moléculas de imunoglobulina, se associe por meio da região constante (ou sub-região) para formar um complexo homodimérico com cadeias peptídicas ligadas por ligações dissulfeto. Para obter alto nível de expressão de uma molécula tetravalente
25 estável com alta afinidade por seu alvo CD20, o ligante *scorpion* entre a sub-região constante e o segundo domínio de ligação deve obedecer as seguintes considerações. Primeiro, o impedimento estérico entre os domínios de ligação homólogos carregado pelos dois fragmentos scFv (um
30 fragmento scFv em cada um dos dois monômeros de *scorpion*)

deve ser minimizado para facilitar a manutenção das conformações nativas de cada domínio de ligação. Segundo, as configurações e orientações dos domínios de ligação devem permitir a associação produtiva de domínios e alta
5 afinidade ligação de cada domínio de ligação ao seu alvo. Terceiro, o próprio ligante *scorpion* deve ser relativamente resistente à protease e não imunogênico.

Na construção de *scorpion* CD20xCD20 exemplar S0129, o terminal C de C_{H3} e o segundo domínio de scFV anti-CD20
10 estavam ligados pelo ligante *scorpion* 2H7, um peptídeo derivado de, e que corresponde a, um fragmento de uma seqüência natural de dobradiça de IgG1 humana. O ligante *scorpion* 2H7 serviu como base para os esforços com o uso de modelagem por computador destinados a aumentar a expressão
15 de *scorpions* e aprimorar as características de ligação das moléculas expressas.

Para analisar o ligante *scorpion* 2H7, a estrutura tridimensional de uma forma dimerica da dobradiça de IgG1 humana foi modelada usando o software Insight II. A
20 estrutura cristal de scFV anti-CD20 na orientação V_H-V_L foi escolhida como uma estrutura de referência para os domínios de ligação 20-4 (código de entrada no banco de dados de proteínas RCSB: 1A14). Na IgG1 intacta, a dobradiça conecta o terminal C do domínio C_{H1} ao terminal N do domínio C_{H2},
25 com a configuração de cada domínio sendo tal que resíduos de cisteína da dobradiça possam parear para formar um homodímero. Na molécula *scorpion* exemplar, o ligante 2H7 derivado da dobradiça conectava a extremidade do terminal C do domínio *scorpion* derivado do domínio C_{H3} de IgG1 à
30 extremidade do terminal N daquela porção do domínio de

ligação *scorpion* 2 derivado de um domínio V_{H2} de IgG1. Usando a estrutura tridimensional modelada do scFV V_H-V_L , as expectativas da distância ótima entre as extremidades do terminal C dos ligantes 2H7 foram influenciadas por três

5 considerações. Primeiro, a estabilidade da dobradiça deve ser mantida, e a estabilidade é ajudada pela dimerização, por exemplo, homodimerização, o que significa que as cisteínas da dobradiça devem ser capazes de parear na presença dos dois domínios de ligação dobrados. Segundo,

10 dois domínios de ligação, por exemplo, scFVs, devem acomodar os terminais C do ligante 2H7, sem interferência estérica a fim de permitir a dobragem correta da proteína. Terceiro, as CDRs de cada domínio de ligação devem ser estar voltadas na mesma direção, como em um anticorpo

15 nativo, pois cada domínio de ligação do *scorpion* prototípico pode se ligar a receptores adjacentes (CD20) na mesma superfície celular. À luz dessas considerações, espera-se que a distância entre as duas extremidades do terminal N de scFvs seja de aproximadamente 28 Å. Espera-se

20 que a distância entre as extremidades do terminal C dos ligantes 2H7 projetados teoricamente em formas diméricas de *scorpion* seja de cerca de 16 Å. Para acomodar as distâncias esperadas necessárias à otimização do desempenho de um *scorpion*, o terminal C do ligante 2H7 foi

25 estendido em pelo menos 3 aminoácidos. Espera-se que tal extensão permita a formação de ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína do ligante 2H7, para permitir a dobragem correta do domínio de ligação 2 do terminal C, e para facilitar uma orientação correta das CDRs. Além disso,

30 na IgG1 intacta, em função da presença dos domínios C_{H1} e

V_{L1} entre a dobradiça e domínios de ligação, a distância entre os domínios de ligação carregada pelas duas cadeias é ainda aumentada, e espera-se que isso favoreça ainda mais o entrecruzamento de receptores adjacentes na mesma superfície celular. Em função das considerações descritas acima, foi projetado um conjunto de ligantes com comprimentos diferentes (Tabela 10). Para minimizar a imunogenicidade, foram usados resíduos naturais presentes na extremidade do terminal N do domínio C_{H2} (Ala-Pro-Glu-Leu ou APEL) para alongar o ligante *scorpion* 2H7 por adição de seqüência ao terminal C do ligante *scorpion*. As construções mais longas continham uma ou múltiplas unidades do ligante (Gly₄Ser) conhecido por ser resistente à protease e flexível.

As construções de *scorpion* CD20xCD20 contendo ligantes *scorpion* estendidos entre o domínio C_{H3} da sub-região constante e o domínio de ligação de scFv do terminal C foram construídas com o uso de mutagênese por PCR, e subclonadas em um vetor de expressão mamífera convencional.

O efeito do comprimento do ligante sobre a expressão do *scorpion* CD20xCD20 poderia ser analisada comparando-se o rendimento da proteína secretada em experimentos de expressão transitória com a utilização de células COS ou HEK293, ou por análise da síntese e acúmulo de proteína nas células por análises *Western blot* ou por estudos *pulse-chase* com metionina/cisteína marcada com [35]S.

Tabela 10

Nº da Const.	Seq. central do vinc. <i>Scorpion</i> (2H7)	Seqüência da extensão	Seqüência estendida do vinculador <i>scorpion</i>

10

Scorpions glicosilados também são contemplados e, nesse contexto, contempla-se que células hospedeiras que expressem um *scorpion* possam se cultivadas na presença de um modificador de carboidrato, que é aqui definido como um composto orgânico pequeno, preferivelmente de peso molecular menor do que 1.000 dáltons, que inibe a atividade de uma enzima envolvida na adição, remoção ou modificação de açúcares que são parte de um carboidrato anexado a um polipeptídeo, como ocorre durante a maturação de carboidrato ligada ao N de uma proteína. A glicosilação é um processo complexo que ocorre no retículo endoplasmático ("glicosilação central") e nos corpos de Golgi ("glicosilação terminal"). Diversos inibidores de glicosidase e/ou manosidase fornecem um ou mais dos efeitos desejados de aumento da atividade ADCC, aumento da ligação de receptor Fc e alteração do padrão de glicosilação. Inibidores exemplares incluem, sem limitação, castanospermina e kifunensina. Os efeitos da expressão de *scorpions* na presença de pelo menos um desses inibidores

serão revelados no exemplo seguinte.

Exemplo 13

Níveis de expressão e caracterização da proteína *scorpion*

Os níveis de expressão da proteína *scorpion* foram
5 determinados e as proteínas expressas foram caracterizadas
para demonstrar que o design da proteína leva a produtos
que possuem benefícios práticos. Um *scorpion* monoespecífico
CD20xCD20 e um *scorpion* biespecífico CD20xCD37 foram
expressos in células CHO DG44 em cultura utilizando as
10 técnicas convencionais.

Foi observado o nível basal da expressão estável do
scorpion CD20xCD20 S0129 (21m20-4x21m20-4) em células CHO
DG44 cultivadas na presença de vários suplementos
nutrientes, como mostrado na Fig. 34. Todos os meios de
15 cultura continham metotrexato 50 nM, uma concentração que
mantinha o número de cópias do polinucleotídeo codificador
de *scorpion*. O polinucleotídeo continha uma região
codificadora para a proteína *scorpion* que não era códon-
otimizada para a expressão em células CHO DG44. O
20 polinucleotídeo foi introduzido em células com o uso do
vetor pD18. Como fica evidenciado pela Fig. 34, foram
obtidos níveis de expressão de cerca de 7-46 µg/ml.

Também foram determinados os níveis de expressão após
amplificação do polinucleotídeo que codifica um *scorpion*
25 biespecífico CD20xCD37. O vetor pD18 foi usado para clonar
a região codificadora do *scorpion* CD20xCD37 e o plasmídeo
foi introduzido em células CHO DG44. A amplificação do
polinucleotídeo codificador foi obtida com o uso da
metodologia de *dhfr*-metotrexato conhecida na técnica, em
30 que são usadas concentrações crescentes de MTX para

selecionar um número de cópia aumentado do gene de diidrofolato redutase (*dhfr*), o que leva à co-amplificação do polinucleotídeo de interesse intimamente ligado. A Fig. 35 mostra que foram observados tipicamente níveis estáveis de expressão de cerca de 22-118 µg/ml do *scorpion* biespecífico CD20xCD37. A variabilidade do rendimento foi observada sob diferentes condições, incluindo concentração de metotrexato usada para amplificação, mas essas variáveis são passíveis de otimização por aqueles habilitados na técnica. Diversas outras moléculas *scorpion* aqui descritas também foram submetidas às análises de expressão em células CHO e/ou COS, com os resultados apresentados na Tabela 11, abaixo. Esses resultados demonstram que podem ser obtidos rendimentos significativos de proteínas *scorpion* com a utilização de técnicas convencionais e otimização de rotina da técnica de amplificação.

As proteínas expressas também foram caracterizadas por análise SDS-PAGE para avaliar os graus de homogeneidade e integridade das proteínas expressas, e para confirmar o peso molecular de peptídeos monoméricos. Os géis de poliacrilamida desnaturantes (Tris Glicina 4-20%) foram processados sob condições redutoras e não redutoras. Os resultados apresentados na Fig. 36 revelam bandas únicas de proteína para cada um de SMIP 2Lm20-4 SCC e *scorpion* monoespecífico S1000 (CD20(21m20-4)xCD20(21m20-4) (S0126) dos pesos moleculares monoméricos esperados sob condições redutoras. Esses dados estabelecem que SMIPs e *scorpions* são passíveis de purificação em uma forma intacta. Sob condições não redutoras, foi observada uma quantidade residual de um peptídeo consistente com o tamanho esperado

de um SMIP monomérico, com a grande maioria da proteína aparecendo em um única banda bem definida consistente com uma estrutura dimérica. Sob essas condições não redutoras, a proteína do *scorpion* monoespecífico mostrou uma única
 5 banda bem definida de um peso molecular consistente com uma estrutura dimérica. As estruturas diméricas tanto do SMIP quanto do *scorpion* são consistentes com suas estruturas monoméricas, cada uma delas contendo um ligante *scorpion* dobradiça-like que contém pelo menos uma cisteína capaz de
 10 participar na formação de ligação dissulfeto.

O efeito dos ligantees *scorpion* sobre a expressão e integridade de *scorpions* também foi avaliado, e os resultados são mostrados na Tabela 12. Essa tabela lista variantes do ligante *scorpion* do *scorpion* monoespecífico
 15 CD20xCD20 (2Lm20-4x2Lm20-4) S0129 e do *scorpion* CD20xCD28 S0033 (2H7sccpIgG1-H7-2e12), sua integridade como moléculas de cadeia única, e seus níveis de expressão transitória em células COS em relação ao *scorpion* parente S0129 ou S0033, como apropriado, com um ligante H7 (definido como 100%).

20 A Tabela 13 fornece dados que resultam de uma avaliação de variantes do ligante *scorpion* incorporadas no *scorpion* CD20xCD20, juntamente com dados análogos para o *scorpion* CD20xCD28. A Tabela 13 fornece dados que resultam de uma avaliação de variantes de S0129 contendo ligantees *scorpion*
 25 que não são ligantees dobradiça-like que contém pelo menos uma cisteína capaz de formação de ligação dissulfeto; em vez disso, os ligantees *scorpion* nessas moléculas são derivados de pedúnculos de lectina C do Tipo II. Fica evidente a partir dos dados apresentados na Tabela 13 que
 30 ligantees *scorpion* dobradiça-like podem estar associados

aos *scorpions* expressos em níveis maiores ou menores do que o ligante *scorpion* parente não modificado em ensaios de expressão transitória. Além disso, algumas das variantes de ligante exibem maior resistência à clivagem proteolítica do que o ligante parente não modificado, uma preocupação para todas ou quase todas as proteínas expressas. Os dados da Tabela 13 mostram que ligantes não dobradiça-like como, por exemplo, ligantes derivados da região peduncular de lectinas C do Tipo II, são encontrados em *scorpions* que exibem características de ligação que variam ligeiramente dos *scorpions* que contêm ligantes *scorpion* dobradiça-like. Adicionalmente, o *scorpion* que contém um ligante *scorpion* não dobradiça-like exibe função efetora (ADCC) que se igualam ou excedem a ADCC associada aos *scorpions* que possuem ligantes *scorpion* dobradiça-like.

Tabela 11

Nome do ligante	Sequência ascendente (CH3)	Variantes do ligante S0129 (2Lm20-4 x 2Lm20-4) - aa seq1	Baseada em	AAs	Expressão em COS ²	Clivado ³	Expressão em CHO ²
H7	QKSLSLSPGK	GCPPCPNS	H7	18	100	-	100
H16	QKSLSLSPGK	LSVKADFLTPSIGN	CD80	25	174	+	
H18	QKSLSLSPGK	LSVLANFSQPEIGN	CD86	25	165	++	
H19	QKSLSLSPGK	LSVLANFSQPEISCPNPCNS	CD86 + H7	30	161	+	109
H26	QKSLSLSPGK	RIHQMNSELSVLANS	CD86	25	170	++	
H32	QKSLSLSPGK	RIHLNVSERPFPNPNS	CD22	25	184	++	
H47	QKSLSLSPG	LSVKADFLTPSIGN	H36	24	141	-	206
H48	QKSLSLSPG	KADFLTPSIGN	H16	21	137	-	
H50	Q	LSVLANFSQPEIGN	H18	16	21	-	
H51	QKS	LSVLANFSQPEIGN	H18	18	110	-	
H52	QKSLSLSPG	SQPEIVPISNS	H18	20	95	-	
H53	QKSLSL	SQPEIVPISCPNPCNS	H19	26	95	-	
H54	Q	SVLANFSQPEISCPNPCNS	H19	21	72	+/-	
H55	QKSLSLSPG	RIHQMNSELSVLANS	H26	24	118	+	
H56	QKSLSLSPG	QMNSELSVLANS	H26	21	130	-	163
H57	QKSLSLSPG	VSERPFPNPNS	H32	19	118	-	
H58	QKSLSLSPG	KPFFTCGSADTCPNS	CD72	24	103	-	
H59	QKSLSL	KPFFTCGSADTCPNS	CD72	20	84	-	

- 25 1 NFS é um motivo de consenso de glicosilação
 2 Expressão transitória em COS (placas 6W) ou CHO (frasco simples) reletivo a S0129-H7 (%)
 3 Produtos do clivado observados por SOS-PAGE/corante de prata: - = nenhum; + = banda fraca; ++ = bandas forte; +++>50% clivado

Tabela 12

Nome do ligante	Variantes do ligante S0129 (2Im20-4x2Im20-4) - seq. de aa	Alterações em CH3? ¹	Seq. ligantea baseada em	Expressão de 20x20? ²	Clivagem de 20x20? ³
H7	GCPPCPNS	N	H7	100	-
H8	GSPPSPNS	N	H7	107	+
H9	GSPPSPNS	S	H7	142	-
H10	EPKSTDKTHTCPPCPNS	N	dobradiça de IgG1	98	-
H11	EPKSTDKTHTSPSPNS	N	dobradiça de IgG1	126	+
H16	LSVKADFLTPSIGN	N	CD80	174	+
H17	LSVKADFLTPSISCPNPCNS	N	CD80 + H7	113	+
H18	LSVLANSQPEIGN	N	CD86	165	++
H19	LSVLANSQPEISCPNPCNS	N	CD86 + H7	161	+
H20	LKIQERVSKPKISNS	N	CD2	115	+++

H21	LKIQERVSKPKISCPPCPNS	N	CD2 + H7	90	+++
H22	LNVSERPFPPHIQNS	N	CD22	149	++
H23	LDVSERPFPPHIQSCPPCPNS	N	CD22 + H7	121	++
H24	REQLAEVTLCLKANS	N	CD80	145	++
H25	REQLAEVTLCLKACPPCPNS	N	CD80 + H7	98	+
H26	RIHQMNSELSVLANS	N	CD86	170	++
H27	RIHQMNSELSVLACPPCPNS	N	CD86 + H7	154	++
H28	DTKGKNVLEKIFSNS	N	CD2	153	+
H30	LPPETQESQEVTLNS	N	CD22	78	+
H32	RIHLNVSERPFPFNS	N	CD22	184	++
H33	RIHLNVSERPFPFPPCPNS	N	CD22 + H7	74	+
H36	GCPPCPGGGGSNS	N	H7	110	+
H40	GCPPCPANS	S	H7	110	+
H41	GCPPCPANS	S	H7	102	-

H42	GCPPCPNS	S	H7	99	-
H44	GGASCPPCPGNS	S	H7	108	+
H45	GGASCPPCAGNS	S	H7	107	-
H46	GGASCPPCANS	S	H7	98	-
H47	LSVKADFLTPSIGNS	S	CD80	141	-
H48	ADFLTPSIGNS	N	CD80	137	-
HSO	LSVLANSQPEIGNS	S	CD86	21	-
H51	LSVLANSQPEIGNS	S	CD86	110	-
H52	SQPEIVPISNS	S	CD86	95	-
H53	SQPEIVPISCPPCPNS	S	CD86 + H7	95	-
H54	SVLANFSQPEISCPPCPNS	S	CD86 + H7	72	+/-
H55	RIHQMNSELSVLANS	S	CD86	118	+
H56	QMNSELSVLANS	S	CD86	130	-
H57	VSERPPFPNS	S	CD22	118	-
H58	KPFFTCGSADTCPNS	S	CD72	103	-
H59	KPFFTCGSADTCPNS	S	CD72	94	-

H60		QYNCPGQYTFSMNS	S	CD69	>100 ⁵	-
H61		EPAFTPGPNIELQKSDCNS	S	CD94	>100	-
H62		QRHNNSSLNTRTQKARHCNS	S	NKG2A	>100	-
H63		NSLFNQEVQIPLTESYCNS	S	NKG2D	>100	-

¹ Alterações adicionais à extremidade de CH3, por exemplo, eliminação 1-9 aa e/ou otimização de códon

² Expressão transitória em COS (placas 6W), em relação ao S0129-H7 parente (%)

³ Produto(s) de clivagem observado por SDS-PAGE/coloração com prata:

- = nenhum, + = banda fraca, ++ = banda(s) importante(s), +++ >50% clicado

⁵ Variantes H60-H63 comparadas por estimativa de recuperação de proteína purificada de meios gastos por COS.

Tabela 13

Proteína s	Descriçã o	Rend. de prod. (µg de proteína purificad	% POI (PM M em Kd por MALS)	Aumento em relação ao POI de S0129wt	Ligação às células Ramos	Ensaio ADCC	Seqüência do ligante scorpion

		a/m sup.)							
S0129wt	Ligante H7	1,6	67 (167)	-	-	-	-	GCPPC	
S0129- CD69	Pedúnculo de CD69	2,9	66 (167)	1,8	Mais fraca do que S0129wt	*Ligeirament e melhor do que o POI de S0129wt	QYNCPGQYTFSM		
S0129- CD72	Pedúnculo truncado de CD72	2,0	69 (165)	1,2	Similar a S0129wt	*Ligeirament e melhor do que o POI de S0129wt	PFFTCGSADTC		
S0129- CD94	Pedúnculo de CD94	2,9	67 (171)	1,8	Similar a S0129wt	*Ligeirament e melhor do que o POI de S0129wt	EPAFTPGPNIE LQKDSDC		
S0129- NKG2A	Pedúnculo de NKG2A	2,5	93 (170)	2,2	*Ligeiramen te melhor do que	Similar ao o POI de S0129wt	QRHNNSSLNT RTQKARHC		

S0129-NKG2D	Pedúnculo de NKG2D	1,9	70 (166)	1,2	Similar a S0129wt	S0129wt	*Ligeirament e melhor do que o POI de S0129wt	NSLFNQEVQIP LTESYC	

Como observado no exemplo precedente, a produção por expressão de *scorpions* em culturas contendo um modificador de carboidrato é contemplada. Em modalidades exemplares, castanospermina (PM 189,21) é adicionada ao meio de cultura até uma concentração final de cerca de 200 μM (que corresponde a cerca de 37,8 $\mu\text{g/ml}$), ou faixas de concentração acima de cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 ou 150 μM , e até cerca de 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60 ou 50 $\mu\text{g/ml}$. Por exemplo, faixas de 10-50 ou 50-200, ou 50-300, ou 100-300, ou 150-250 μM são contempladas. Em outras modalidades exemplares, DMJ, por exemplo, DMJ-HCl (PM 199,6) é adicionado ao meio de cultura até uma concentração final de cerca de 200 μM (que corresponde a cerca de 32,6 μg de DMJ/ml), ou faixas de concentração acima de cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, ou 150 μM , e até cerca de 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60 ou 50 $\mu\text{g/ml}$. Por exemplo, faixas de 10-50, ou 50-200, ou 50-300, ou 100-300, ou 150-250 μM são contempladas. Em outras modalidades exemplares, kifunensina (PM 232,2) é adicionada ao meio de cultura até uma concentração final de cerca de 10 μM (que corresponde a cerca de 2,3 $\mu\text{g/ml}$), ou faixas de concentração acima de cerca de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 μM , e até cerca de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 ou 11 μM . Por exemplo, faixas de 1-10, ou 1-25, ou 1- 50, ou 5-10, ou 5-25, ou 5-15 μM são contempladas.

Em um experimento, um *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 (S0129) foi expresso em células cultivadas em 200 μM de castanospermina (S0129 C5200) ou 10 μM (excesso) de

kifunensina (S0129 KF 10) e a ligação, ou coloração, de células WIL-2S pelo *scorpion* expresso foi medida, como mostrado na Fig. 42. Além disso, estudos comparativos de ligação, um *scorpion* S0129 glicosilado se ligou ao CD16
 5 (FCγRIII) aproximadamente três vezes melhor do que o *scorpion* S0129 não glicosilado.

Em outro estudo, a morte mediada por ADCC de células B BJAB por *scorpion* CD20xCD20 humanizado (S0129) foi explorada. Os resultados mostrados na Fig. 43 estabelecem
 10 que o *scorpion*, quando expresso em células cultivadas na presença de castanospermina ou kifunensina, leva a uma morte mediada por ADCC de células B BJAB significativamente mais potente para certa concentração de exposição ao *scorpion*.

15

Exemplo 14

Ligação de *scorpion*

a. Espaçamento do domínio

Scorpions biespecíficos são capazes de se ligar a pelo menos dois alvos simultaneamente, utilizando os pares de
 20 domínios de ligação nos terminais N e C da molécula. Ao fazê-lo, para alvos na superfície celular, a composição pode entrecruzar ou causar a co-aproximação física dos alvos. Será observado por aqueles habilitados na técnica que muitos sistemas de receptores são ativados por meio
 25 deste entrecruzamento, resultando em indução de sinal que produzem alterações no fenótipo celular. O design das composições aqui reveladas teve o objetivo, em parte, de maximizar essa sinalização e controlar o fenótipo resultante.

30

As dimensões aproximadas das composições de domínios

do *scorpion*, bem como as expectativas de flexibilidade interdomínios em termos de faixas de ângulos interdomínios, são conhecidas e foram consideradas no projeto da arquitetura do *scorpion*. Para *scorpions* que utilizam

5 domínios de ligação scFv para os domínios de ligação 1 e 2 (BD1 e BD2), uma dobradiça do terminal N de IgG1 (H1), e o ligante H7 PIMS aqui descrito, o domínio de ligação no terminal N e o domínio de ligação no terminal C podem estar, no máximo, a cerca de 150-180 Å de distância e, no

10 mínimo, a cerca de 20-30 Å de distância. Os domínios de ligação no terminal N podem estar, no máximo, a cerca de 90-100 Å de distância e, no mínimo, a cerca de 10-20 Å de distância (Deisenhofer, e cols., 1976, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd.* 357, S. 435-445; Gregory, e cols., 1987,

15 *Mol. Immunol.* 24(8): 821-9.; Poljak, e cols., 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1973, 70: 3.305-3.310; Bongini, e cols., 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 6.466-6.471; Kienberger, e cols., 2004, *EMBO Reports*, 5: 579-583, cada um deles aqui incorporado por referência). A escolha dessas dimensões foi

20 feita, em parte, para permitir distâncias receptor-receptor de menos de cerca de 50 Å em complexos receptores ligados ao *scorpion*, na medida em que distâncias abaixo desta podem ser ótimas para a sinalização máxima de certos oligômeros de receptor (Paar, e cols., 2002, *J. Immunol.*, 169: 856-

25 864, aqui incorporado por referência), ao mesmo tempo em que permitem a incorporação de estruturas Fc necessárias para a função efetora.

Os domínios de ligação nos terminais N e C de *scorpions* foram projetados para serem estruturas flexíveis

30 para facilitar a ligação ao alvo e permitir uma variedades

de geometrias dos alvos ligados. Também será observado por aqueles habilitados na técnica que a flexibilidade entre os domínios de ligação do terminal N ou C (BD1 e BD2, respectivamente) e entre os domínios de ligação e o domínio F_C da molécula, bem como as distâncias máximas e mínimas entre receptores ligados por BD1 e/ou BD2, podem ser modificadas, por exemplo, por escolha de domínio de dobradiça do terminal N (H1) e, por analogia estrutural, pelo domínio do ligante *scorpion* localizado mais próximo ao terminal C (H2). Por exemplo, domínios de dobradiça de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA2, dobradiças sintéticas e o domínio C_{H2} dobradiça-like de IgM mostra graus diferentes de flexibilidade, além de diferentes comprimentos. Aqueles habilitados na técnica saberão que a escolha ótima de H1 e do ligante *scorpion* (H2) dependerá do sistema(s) receptor para o qual o *scorpion* é projetado para interagir, bem como do fenótipo de sinalização desejado induzido pela ligação do *scorpion*.

Em algumas modalidades, os *scorpions* possuem um ligante *scorpion* (H2) que é um ligante dobradiça-like que corresponde a uma dobradiça de Ig, por exemplo, uma dobradiça de IgG1. Essas modalidades incluem *scorpions* que possuem uma seqüência de aminoácidos da dobradiça de *scorpion* que se estende em direção ao terminal N em relação, por exemplo, à seqüência H7 ou à seqüência de dobradiça de IgG1 do tipo selvagem. Ligantees *scorpion* exemplares desse tipo teriam a seqüência da dobradiça H7 se estendendo em direção ao terminal N por H₂N-APEL(x)_y-CO₂H, em que x é uma unidade do ligante Gly₄Ser e y é um número entre 0 e 3. Para exemplificar a influência

do ligante *scorpion* sobre a estabilidade do *scorpion*, foi feito um estudo com o uso de dois *scorpions*, um *scorpion* biespecífico CD20xCD28 e um *scorpion* monoespecífico CD20xCD20. Para cada um desses dois designs de *scorpion*, foram inseridos vários ligantees *scorpion*. Em particular, os ligantees *scorpion* H16 e H17, que basicamente diferem pelo fato de que H17 possui a sequência de H16 com a sequência de H7 anexada ao terminal C, e ligantees *scorpion* H18 e 19, nos quais analogamente a sequência de H7 está anexada ao terminal C de H18 na geração de H19. Para cada uma dessas duas estruturas centrais de *scorpion* (20x28 e 20x20), cada um dos quatro ligantees *scorpion* descritos acima foi inserido na localização apropriada. A expressão transitória dessas construções foi obtida em células COS, e as proteínas *scorpion* encontradas nos sobrenadantes de cultura foram purificadas em poços revestidos com proteína A/G (Pierce kit SEIZE IP). As proteínas purificadas foram fracionadas em géis de SDS-PAGE e visualizadas por coloração com prata. A inspeção da Fig. 44 revela que a sequência adicional H7 no ligante *scorpion* se soma à estabilidade de cada tipo de ligante *scorpion* e cada tipo de proteína *scorpion*. Em outras palavras, a anexação de H7 ao terminal C de H16 ou H18 se somou à estabilidade da molécula *scorpion*, e essa observação ocorria independentemente do *scorpion* ser CD20xCD28 ou CD20xCD20. In termos ligação ao alvo, as proteínas *scorpion* que possuem a arquitetura CD20xCD20 exibiram propriedades de ligação similares às do *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 humanizado parente S0129, como mostrado na Fig. 45.

Além das modalidades precedentes, no entanto, pode ser

desejável evitar que os receptores ligados se aproximem a cerca de 50 Å uns dos outros para intencionalmente criar sinais submáximos (Paar, e cols., *J. Immunol.*, 169: 856-864). Nesse caso, seria adequada a escolha de H1 e ligante 5 *Scorpion* (H2) que fossem mais curtos e menos flexíveis do que aqueles descritos acima.

As mesmas considerações sobre espaçamento se aplicam aos ligantes *scorpion* que não são dobradiça-like. Esses ligantes *scorpion* são exemplificados pela classe de 10 peptídeos que possuem a seqüência de aminoácidos de uma região peduncular de uma lectina C. Dobradiças de *scorpion* exemplares que compreendem uma região peduncular de lectina C são dobradiças de *scorpion* derivadas da região peduncular CD72, da região peduncular CD94 e da região peduncular 15 NKG2A. *Scorpions* que contêm essas dobradiças de *scorpion* foram construídos e caracterizados em termos de expressão, susceptibilidade à clivagem e possibilidade de purificação. Os dados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14

Nome do vinc.	Otimização de códon G4S ¹	Final de CH3	Variantes do ligante scorpion S0129 Seq. de aminoácidos	Seq. do ligante baseada em	Expressão (% de S0129) ²	Clivagem ³	Purificação bench-top %POI
H7	N	K	GCPPCPNS	H7	100	-	70
H60	S (17)	K	GCPPCPNS	H7	114	-	ND
H61	S (15)	K	GCPPCPNS	H7	90	-	66
H62	N	G	QRHNSSSLNTRTQKARHCPNS	pedúnculo de NKG2A	129	-	89
H63	S (17)	G	QRHNSSSLNTRTQKARHCPNS	pedúnculo de NKG2A	100	-	85
H64	S (15)	G	QRHNSSSLNTRTQKARHCPNS	pedúnculo de NKG2A	81	-	83
H65	N	G	EPAFTPGPNIELQKDSDCPNS	pedúnculo de CD94	133	-	66
H66	S (17)	G	EPAFTPGPNIELQKDSDCPNS	pedúnculo de	200	-	64

				CD94				
H67	S (15)	G	EPAFTPGPNIELQKSDCPNS	pedúnculo de CD94	129	-	65	
H68	N	G	RTRYLQVSQQLOQTNRVLEVTNSSL	pedúnculo completo de CD72	110	-	75	
			RQQLR					
			LKITQLGQSAEDLQGSRRRLAQSQE					
			ALQVEQ					
			RAHQAAEGQLQACQADRQKTKETLQ					
			SEEQ					
			QRRALQKLSNMENRLKPFFTCGSA					
			DTC					

¹ Otimização de códon do ligante Gly₄Ser, com (17) ou sem (15) sítio de restrição

² Estimativa da expressão em COS com base na recuperação de proteína na purificação benchtop

³ Produto(s) de clivagem observado por SDS-PAGE/coloração com Azul Coomassie de proteína purificada

b. Ligação de domínios de ligação dos terminais N e C

Os domínios do terminal C e do terminal N participam na ligação à célula-alvo

As habilidades de ligação à célula-alvo de um SMIP de
 5 CD20 (TRU015), de um SMIP de CD37 (SMIP016), de uma
 combinação de CD20 e SMIP de CD37S (TRU015+SMIP016) e do
scorpion biespecífico CD20xCD37 (015x016) foram avaliadas
 pela medida da capacidade de cada uma dessas moléculas para
 bloquear a ligação de um anticorpo que compete
 10 especificamente pela ligação ao alvo relevante, CD37 ou
 CD20. Os anticorpos de competição eram anticorpo monoclonal
 anti-CD37 marcado com FITC ou anticorpo monoclonal anti-
 CD20 marcado com PE, como apropriado. Células B Ramos
 forneceram os alvos.

15 Células B Ramos a $1,2 \times 10^7$ /ml em PBS com soros de
 camundongo 5% (#100-113, Gemini Bio-Products, West
 Sacramento, CA) (meios de coloração) foram adicionados a
 placas de 96 poços com fundo em "V" (25 µl/poço). Os vários
 SMIPs e *scorpions* foram diluídos até 75 µg/ml em meios de
 20 coloração e foram feitas diluições de 4 vezes até as
 concentrações indicadas na Fig. 38. Os compostos diluídos
 foram adicionados às células plaqueadas em adição aos meios
 isoladamente para poços de controle. As células foram
 incubadas por 10 minutos com os compostos, e depois
 25 anticorpo anti-CD37 com FITC (#186-040, Ancell, Bayport,
 MN) a 5 µg/ml e anticorpo anti-CD20 com PE (#555623, BD
 Pharmingen, San Jose, CA) a 3 µg/ml (puro) foram
 adicionados em conjunto aos poços em 25 µl de meios de
 coloração. As células foram incubadas no gelo no escuro por
 30 45 minutos, e depois lavadas 2,5 vezes com PBS. As células

foram fixadas com paraformaldeído 1% (#19943 1 LT, USB Corp, Cníveland, OH) e depois processadas em um FACs Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA).

Os dados foram analisadas com o software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). Os resultados mostrados na Fig. 38 estabelecem que todos os SMIPs, combinações de SMIP e *scorpions* contendo um sítio de ligação de CD20 competiram com sucesso com anticorpo anti-CD20 marcado com PE pela ligação às células B Ramos (painel superior); todos os SMIPs, combinações de SMIP e *scorpions* contendo um sítio de ligação para CD37 competiram com sucesso com anticorpo anti-CD37 marcado com FITC pela ligação às células B Ramos (painel inferior). O *scorpion* biespecífico CD20xCD37, portanto, demonstrou ter sítios de ligação no terminal N e C operacionais para alvos em células B.

c. Persistência na superfície celular

Uma investigação da persistência na superfície celular de SMIPs e *scorpions* (monoespecífico e biespecífico) ligados na superfície de células B revelou que *scorpions* exibiram maior persistência na superfície celular do que SMIPs. Células B Ramos a $6 \times 10^6/\text{ml}$ ($3 \times 10^5/\text{poço}$) em meios de coloração (soro de cabra 2,5%, soros de camundongo em PBS 2,5%) foram adicionadas às placas de 96 poços com fundo em "V". Os reagentes de teste foram preparados em duas vezes a concentração final em meios de coloração por produção de uma diluição serial de 5 vezes de um estoque inicial de 500 nM, e depois foram adicionados 1:1 às células B Ramos. Além disso, também foram plaqueados controles de meios. As células foram incubadas no escuro, no gelo, por 45 minutos. As placas foram então lavadas 3,5

vezes com PBS gelado. O reagente secundário, anticorpo de cabra anti-IgG humana com FITC (#H10501, Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA) foi então adicionado em uma diluição de 1:100 em meios de coloração. As células foram incubadas por 30 minutos no escuro, no gelo. As células foram então lavadas 2,5 vezes por centrifugação com PBS gelado, fixadas com uma solução de paraformaldeído 1% (#19943 1 LT, USB Corp, Cníveland, OH) e depois processadas em um FACs Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Os dados foram analisadas com o software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). Os resultados da análise dos dados são apresentados na Fig. 37, que mostra a ligação de vários SMIPs, um *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 e um *scorpion* biespecífico CD20xCD37 aos seus alvos em células B Ramos.

Dois tubos de células B Ramos ($7 \times 10^5/\text{ml}$) foram incubados por 30 minutos no gelo, com cada um dos dois compostos sendo investigado, ou seja, um SMIP de CD20 humanizado (2Lm20-4) e um *scorpion* humanizado CD20xCD20 (2Lm20-4x2Lm20-4), cada um a $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ em meios Iscoves com FBS 10%. Ao final do período de incubação, ambos os tubos foram lavados 3 vezes por centrifugação. Um tubo de células foi então plaqueado em uma placa de 96 poços com fundo achatado as 2×10^5 células/poço em $150 \mu\text{l}$ de meios Iscoves, com uma placa então indo para uma incubadora a 37°C e a outra incubada no gelo. O segundo tubo de cada conjunto foi ressuspenso em PBS gelado com soro de camundongo 2% e azida de sódio 1% (meios de coloração), e plaqueado em uma placa de 96 poços com fundo em "V" a 2×10^5 células/poço para coloração imediata com o anticorpo secundário, ou seja, anti-IgG humana de cabra conjugada a

FITC (#H10501, Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA). O anticorpo secundário foi adicionado em uma diluição final de 1:100 em meios de coloração, e as células foram coradas no gelo, no escuro, por 30 minutos. As células foram então
 5 lavadas 2,5 vezes com PBS gelado, e fixadas com paraformaldeído 1% (#19943 1 LT, USB Corp, Cníveland, OH).

Nos momentos designados na Fig. 39, as amostras foram coletadas das placas de 96 poços com fundo achatado, incubadas a 37°C ou no gelo, e colocadas em placas de 96
 10 poços com fundo em "V" (2×10^5 células/poço). As células foram lavadas uma vez com meios de coloração gelados, ressuspensas, e o anticorpo secundário foi adicionado em uma diluição final de 1:100 em meios de coloração. Essas células foram incubadas no gelo, no escuro, por 30 minutos.
 15 As células foram então lavadas 2,5 vezes por centrifugação em PBS gelado, e subsequente fixadas com paraformaldeído 1%. As amostras foram processadas em um FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA) e os dados analisados com o software CellQuest (BD Biosciences, San
 20 Jose, CA). Os resultados apresentados na Fig. 39 demonstram que a ligação de um SMIP e um *scorpion* à superfície de células B persiste por pelo menos seis horas, com o *scorpion* monoespecífico humanizado CD20xCD20 (2Lm20-4x2Lm20-4) persistindo por um período mais prolongado do
 25 que SMIP de CD20 humanizado (2Lm20-4).

Exemplo 15

Morte celular direta por *scorpions* monoespecíficos e biespecíficos

Foram feitos experimentos para avaliar a capacidade de
 30 moléculas de *scorpion* monoespecífico e biespecífico para

matar diretamente células de linfoma, ou seja, matar essas células sem envolvimento de ADCC ou CDC. Em particular, as linhagens de células de linfoma Su-DHL-6 e DoHH2 foram submetidas separadamente a um *scorpion* monoespecífico, ou
5 seja, um *scorpion* CD20xCD20 ou um *scorpion* CD37xCD37, ou a um *scorpion* biespecífico CD20xCD37.

Culturas de células de linfoma Su-DHL-6, DoHH2, Rec-1 e WSU-NHL foram estabelecidas com a utilização de técnicas convencionais, e algumas dessas culturas foram então
10 expostas individualmente a um SMIP de CD20 monoespecífico, um *scorpion* monoespecífico (CD20xCD20 ou CD37xCD37) ou um *scorpion* biespecífico (CD20xCD37 ou CD19xCD37). A exposição de células aos SMIPs ou aos *scorpions* foi efetuada sob condições que não resultam em entrecruzamento. As células
15 permaneceram em contato com as moléculas por 96 horas, e após esse período o crescimento foi medido por detecção de ATP, como é conhecido na técnica. A morte celular atribuível ao SMIP de CD20 e ao *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 é aparente na Fig. 24 e na Tabela 15. A
20 capacidade de morte celular do *scorpion* monoespecífico CD37xCD37 é aparente na Fig. 25 e na Tabela 15, a habilidade do *scorpion* biespecífico CD20xCD37 para matar células de linfoma é aparente na Fig. 26 e na Tabela 15 e a capacidade do *scorpion* biespecífico CD19xCD37 para matar
25 células de linfoma é evidente na Fig. 27 e na Tabela 15. Os dados foram reunidos em *pool* a partir de três experimentos independentes, e os pontos representam a média $\pm$ SEM. Os valores de IC₅₀ na Tabela 15 foram determinados a partir das curvas nas Figs. 24, 25 e 26, como observado na legenda
30 da Tabela 15, e são definidos como a concentração que

resulta em 50% de inibição, comparada como culturas não tratadas. Os dados nas figuras e na tabela demonstram que *scorpions* são mais de 10 vezes mais potentes na morte dessas linhagens celulares do que o SMIP livre usando os

5 mesmos domínios de ligação.

Tabela 15

IC ₅₀ (nM)	Linhagem celular		
	SU-DHL-6	DoHH2	WSU-NHL
SMIP de CD20 *	>100	60	NA
scorpion CD20xCD20 *	0,3	4,0	NA
SMIP de CD37 **	>100	>100	NA
scorpion CD37xCD37 **	10	1,2	NA
SMIP de CD20 e SMIP de CD37 ***	6	2	NA
scorpion CD20xCD37 ***	0,05	0,05	NA
SMIP de CD19 e SMIP de CD37 ****	0,16	NA	0,40
scorpion CD19xCD37 ****	0,005	NA	0,04

* Data derivados da Fig. 24.

** Data derivados da Fig. 25.

*** Data derivados da Fig. 26.

10 **** Data derivados da Fig. 27.

Foram efetuados experimentos adicionais com o *scorpion*

CD20xCD20 humanizado S0129 em células Su-DHL-4, Su-DHL-6, DoHH2, Rec-1 e WSU-NHL. Os resultados são apresentados na Fig. 46 e na Fig. 47. Os dados fornecidos nessas figuras estendem os achados discutidos acima ao mostrarem que

5 *scorpions* possuem a capacidade de matar diretamente diversas linhagens celulares.

Os achados acima foram estendidos a outros *scorpions* monoespecíficos e biespecíficos, com cada *scorpion* demonstrando capacidade para matar diretamente células B.

10 Células B DoHH2 foram expostas *in vitro* ao *scorpion* monoespecífico CD20xCD20, a um *scorpion* monoespecífico CD37xCD37 ou a um *scorpion* biespecífico CD20xCD37. Os resultados apresentados na Fig. 48 demonstram que *scorpions* biespecíficos possuem curvas de morte que são diferentes na

15 forma de *scorpions* monoespecíficos.

O cultivo de células Su-DHL-6 na presença de 70 nM de *scorpion* CD20xCD20 (S0129), *scorpion* CD20xCD37 ou *scorpion* CD37xCD37 também levou à morte direta de células B em um ambiente *in vitro* (Fig. 49). Consistentemente, as células

20 Su-DHL-6 expostas a um *scorpion* biespecífico CD19xCD37 ou ao Rituxan® levaram à morte celular direta, com a letalidade do *scorpion* biespecífico exibindo em doses menores, como revelado na Fig. 50.

Outra demonstração de morte celular direta foi

25 apresentada por exposição de células DHL-4 a quatro *scorpions* monoespecíficos independentes que reconhecem CD20. Foram projetadas duas versões do *scorpion* CD20xCD20 para incorporar dois domínios de ligação 20-4 (20-4x20-4 e S0129) e os dois segundos incorporam um híbrido dos

30 domínios de ligação 011 e 20-4. Todas as quatro versões

construídas e purificadas independentemente dos dois designs de *scorpion* CD20xCD20, (20-4x20-4 e S0129) e híbrido (011x20-4 e 011x20-4AAsp), mataram eficazmente as células DHL-4 de uma forma direta. Para esse estudo, as

5 células DHL-4 foram tratadas *in vitro* com 1 µg/ml das proteínas indicadas por 24 horas. As células foram então coradas com Anexina V e iodeto de propídio, marcadores iniciais e tardios de morte celular, respectivamente, e as populações de células foram quantificadas por FACS. Os

10 resultados apresentados na Fig. 51 estabelecem a capacidade de morte direta de cada uma das construções de CD20xCD20, como evidenciado por coloração aumentada mostrada em barras pretas. Além disso, os resultados demonstram que as proteínas híbridas 011x20-4 exibiram um ligeiro aumento na

15 morte celular direta em relação aos *scorpions* baseados em 20-4x20-4, apesar do fato de que cada um desses *scorpions* reconheceu CD20 de forma monoespecífica. Em um conjunto separado de experimentos, a dose-resposta das quatro construções de *scorpion* independentes foi determinada por

20 análise FACS de populações de células que coraram com Anexina V e iodeto de propídio. Os resultados, mostrados na Fig. 52, demonstram aumentos proporcionais à dose na morte celular resultante de tratamento das células DHL-4 com cada uma das construções de *scorpion* independentes.

25

Exemplo 16

Funções acessórias mediadas por *scorpions* (ADCC & CDC)

a. Citotoxicidade celular dependente de *scorpion*

Foram feitos experimentos para determinar se *scorpions* mediarão a morte de células B BJAB de linfoma. Observou-se

30 que células B BJAB de linfoma eram mortas com *scorpions*

CD20 e/ou CD37.

Inicialmente, 1×10^7 /ml de células B BJAB foram marcadas com 500 μ Ci/ml de ^{51}Cr cromato de sódio (#CJS1, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) por 2 horas a 37°C em
5 meios Iscoves com FBS 10%. As células B BJAB carregadas com ^{51}Cr foram então lavadas 3 vezes em meio RPMI com FBS 10%, e ressuspensas a 4×10^5 /ml em RPMI. Células mononucleares (PBMCs) do sangue periférico de doadores internos foram isoladas de sangue total heparinizado por meio de
10 centrifugação sobre Meio de Separação de Linfócitos (#50494, MP Biomedicals, Aurora, Oh), lavadas 2 vezes com meio RPMI, e ressuspensas a 5×10^6 /ml em RPMI com FBS 10%. Amostras de reagentes foram adicionadas ao meio RPMI com FBS 10% a 4 vezes a concentração final, e foram preparadas
15 três diluições seriais de 10 vezes para cada reagente. Esses reagentes foram então adicionados a placas de 96 poços com fundo em "U" a 50 μ l/poço até as concentrações finais indicadas. As células BJAB marcadas com ^{51}Cr foram então adicionadas às placas a 50 μ l/poço (2×10^4 /poço). As
20 PBMCs foram então adicionadas às placas a 100 μ l/poço (5×10^5 /poço) para uma proporção final de 25:1 de efetores (PBMC):alvo (BJAB). Os efetores e os alvos foram adicionados ao meio isoladamente para medir ao nível de morte de fundo. As células BJAB marcadas com ^{51}Cr foram
25 adicionadas ao meio isoladamente para medir a liberação espontânea de ^{51}Cr , e ao meio com NP40 5% (#28324, Pierce, Rockford, In) para medir a liberação máxima de ^{51}Cr . As placas foram incubadas por 6 horas a 37°C em CO_2 5%. Cinquenta μ l (25 μ l também seriam adequados) do
30 sobrenadante de cada poço foram então transferidos para uma

LumaPlate-96 (#6006633, Perkin Elmer, Boston, Mass) e secos de um dia para o outro em temperatura ambiente.

Após secagem, as emissões radioativas foram quantificadas como cpm em um Packard TopCount-NXT. Os valores da amostra eram a média de amostras em triplicata. O percentual de morte específica foi calculado usando a seguinte equação: % de Morte = ((amostra - liberação espontânea)/(liberação máxima - liberação espontânea)) x 100. Os gráficos na Fig. 30 mostram que as células B BJAB foram mortas por *scorpions* monoespecíficos CD20xCD20 e CD37xCD37. A combinação de SMIP de CD20 e SMIP de CD37 também matou as células B BJAB. Esses resultados demonstram que *scorpions* exibem citotoxicidade celular dependente de *scorpion*, e espera-se que essa funcionalidade seja fornecida pela sub-região constante do *scorpion*, que fornece atividade de ADCC.

b. Papel do *scorpion* na citotoxicidade dependente de complemento

Experimentos também demonstraram que *scorpions* possuem atividade de Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC). O experimento envolveu a exposição de células B Ramos aos SMIPs de CD19 e/ou CD37 e *scorpions*, como descrito abaixo e como mostrado na Fig. 31.

O experimento foi iniciado por adição de 5 a $2,5 \times 10^5$ células B Ramos aos poços de placas de 96 poços com fundo em "V" em 50 µl de meio Iscoves (sem FBS). Os compostos de teste em Iscoves (ou somente Iscoves) foram adicionados aos poços em 50 µl em duas vezes a concentração final indicada. As células e reagentes foram incubados por 45 minutos a 37°C. As células foram lavadas 2,5 vezes em Iscoves sem

FBS, e ressuspensas em Iscoves com soro humano (# A113, Quidel, San Diego, CA) em placas de 96 poços nas concentrações indicadas. As células foram então incubadas por 90 minutos a 37°C. As células foram lavadas por

5 centrifugação e ressuspensas em 125 µl de PBS gelado. As células foram então transferidas para tubos agrupados de FACs (#4410, CoStar, Corning, NY), e 125 µl de PBS com iodeto de propídio (# P-16063, Molecular Probes, Eugene, OR) a 5 µg/ml foram adicionados. As células foram incubadas

10 com o iodeto de propídio por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro, e depois colocadas no gelo, quantificadas e analisadas em um FACsCalibur com o software CellQuest (Becton Dickinson). Os resultados apresentados na Fig. 31 estabelecem que o SMIP de CD19, mas não o SMIP de

15 CD37, exibe atividade de CDC, com uma combinação dos dois SMIPs exibindo aproximadamente o mesmo nível de atividade de CDC que o SMIP de CD19 isoladamente. O *scorpion* CD19xCD37, no entanto, exibiu atividade de CDC significativamente maior do que SMIP isoladamente ou em

20 combinação, estabelecendo que a arquitetura do *scorpion* fornece um nível maior de citotoxicidade dependente de complemento do que outros designs moleculares.

c. Atividade de ADCC/CDC de *scorpions* monoespecíficos CD20xCD20

25 Três *scorpions* monoespecíficos CD20xCD20 distintos foram examinados quanto à funcionalidade de ADCC e CDC, junto com controles apropriados. A ADCC foi testada com o uso de técnicas convencionais, e os resultados são apresentados na Fig. 53. Fica evidente na Figura a

30 atividade de ADCC apreciável, mas não idêntica, associada a

cada um dos *scorpions* monoespecíficos CD20xCD20 testados.

Para avaliar a CDC, amostras de células B Ramos (4×10^5) foram incubadas com cada um dos *scorpions* CD20xCD20 (0, 0,5, 5, 50 e 500 nM) e soro (10%) por 3,5 horas a 37°C.

5 A morte celular foi avaliada por coloração com 7-AAD e análise FACS. Os resultados são apresentados na Fig. 54, que revela que os *scorpions* exibem alguma atividade de CDC. Em um experimento similar, amostras de células B Ramos (4×10^5) foram incubadas com proteína *scorpion* CD20xCD20 (5,
10 50, 100 nM) e soro (10%) por 2 horas a 37°C. As células foram lavadas 2X e incubadas com anticorpo anti-C1q humano com FITC. O C1q ligado foi avaliado por análise FACS, e os resultados são apresentados na Fig. 55. Esses resultados são consistentes com os resultados apresentados na Fig. 54,
15 de que cada um dos *scorpions* monoespecíficos CD20xCD20 estava associado a alguma atividade de CDC, embora menos atividade do que a que estava associada a um SMIP de CD20.

d. Interações de *scorpions* com FcγRIII

estudos ELISA demonstraram que *scorpions* ligados a
20 FcγRIII (CD16) baixo (uma isoforma ou tipo alélico de baixa afinidade) em níveis aumentados na ausência de células-alvo. As placas de ELISA foram inicialmente revestidas com CD16mIgG de baixa ou alta afinidade com a utilização de técnicas convencionais. A habilidade dessa proteína de
25 fusão imobilizada para capturar um SMIP de CD20 ou um *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 foi avaliada. SMIPs e *scorpions* ligados foram detectados com anticorpo secundário anti-IgG humana de cabra (HRP), e a intensidade de fluorescência média (MFI) foi determinada. PBS isoladamente
30 (controle negativo) é mostrado como um ponto único. Os

resultados são apresentados na Fig. 32A (captura pela fusão da isoforma de CD16 de alta afinidade) e 32B (captura pela fusão da isoforma de CD16 de baixa afinidade). Fica evidente a partir das Figs. 32A e 32B que tanto SMIP de
5 CD20 quanto *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 mostraram ligação aumentada para fusões da isoforma de CD16 de alta e baixa afinidade, com o *scorpion* CD20xCD20 mostrando um aumento dramático na ligação à fusão da isoforma de baixa afinidade com concentração crescente de proteína.

10 A ligação de *scorpions* às isoformas de FcγRIII na presença de células-alvo também foi avaliada. Os dados mostram a ligação aumentada de *scorpions* a ambas as isoformas ou tipos alélicos de FcγRIII (CD16), de baixa e alta afinidade, na presença de células-alvo com
15 concentração crescente de proteína.

Na realização do experimento, células-alvo CD20-positivas foram expostas aos SMIPs de CD20 ou aos *scorpions* monoespecíficos CD20xCD20 sob condições que permitiam a ligação do SMIP ou *scorpion* às células-alvo CD20-positivas.
20 Subseqüentemente, a célula-alvo que abriga SMIP ou *scorpion* foi exposta à isoforma de CD16 de alta ou baixa afinidade marcada com IgFc de camundongo. Um Fc anticamundongo de cabra marcada foi então adicionado como anticorpo secundário para marcar o CD16 imobilizado marcado com o
25 IgFc de camundongo. As células foram então detectadas com o uso de citometria de fluxo em um FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA), e analisadas com o software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). Como mostrado na Fig. 33, concentrações aumentadas de cada um dos SMIPs de
30 CD20 e do *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 levam à ligação

aumentada às isoformas de CD16 na presença de células-alvo, com o aumento na ligação do *scorpion* CD20xCD20 sendo mais significativo do que a ligação aumentada observada com o SMIP de CD20.

5

Exemplo 17

Efeitos no ciclo celular de *scorpions* sobre células-alvo de linfoma

Os efeitos no ciclo celular de *scorpions* foram avaliados por exposição de células de linfoma aos SMIPs, *scorpions* monoespecíficos e *scorpions* biespecíficos. Mais particularmente, células de linfoma DoHH2 ($0,5 \times 10^6$) foram tratadas por 24 horas com rituximab 0,4 nM, *scorpion* CD20xCD37, combinação de TRU-015 (SMIP de CD20) + SMIP-016 (0,2 nM cada), SMIP-016 100 nM ou *scorpion* CD37xCD37 100 nM. Essas concentrações representam cerca de 10 vezes mais do que o valor de IC_{50} do *scorpion* em um ensaio de inibição do crescimento de 96 horas (veja as Figs. 24-27). As culturas foram marcadas por 20 minutos a 37°C com BrdU 10 μ M (bromodesoxiuridina). Após fixação, as células foram coradas com anticorpo anti-BrdU-FITC e contra-coradas com iodeto de propídio. Os valores na Fig. 28 representam a média +/- DP de 4 culturas em replicadas de 2-3 experimentos independentes. Todos os dados de amostras foram analisados ao mesmo tempo e reunidos em pool para apresentação com o uso de gráficos de pontos da incorporação de BrdU e PI. Os gráficos demonstram que um efeito importante do tratamento com *scorpion* é uma eliminação de células em fase S, além de um aumento no compartimento G0/G1.

30

Exemplo 18

Efeitos fisiológicos de *scorpions*

a. Potencial mitocondrial

Scorpions CD20xCD20 induziram perda de potencial da membrana mitocondrial em células B DHL4, como revelado em um ensaio de JC-1. JC-1 é um corante catiônico de carbocianina que exibe acúmulo potencial-dependente nas mitocôndrias (Kit de ensaio Mitoprobe® JC-1 para citometria de fluxo de Molecular Probes). JC-1 é mais específico para a membrana mitocondrial do que a para a membrana plasmática, e é usado para determinar mudanças no potencial da membrana mitocondrial. Um acúmulo nas mitocôndrias é indicado por uma mudança na fluorescência de verde (529 nm) para vermelho (590 nm).

Na realização do experimento, células B DHL-4 (5×10^5 células/ml) foram inicialmente cultivadas em placas de 24 poços, e tratadas por 24 horas com 1 µg/ml de *scorpion* CD20xCD20, Rituximab, anticorpo IgG de controle ou 5 µM de estaurosporina a 37°C, CO₂5%, em uma incubadora padronizada de cultura de tecido. O corante JC-1 (10 µl/ml, concentração final de 2 µM) foi adicionado, e as células foram incubadas por mais 30 minutos a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação (5 minutos a 1.200 rpm), lavadas com 1 ml de PBS, e ressuspensa em 500 µl de PBS. As células foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD) com filtros de excitação de 488 nm e de emissão de 530 nm e 585 nm. Para os gráficos representativos de dispersão mostrados na Fig. 56, a fluorescência vermelha foi medida no eixo Y e a fluorescência verde foi medida no eixo X. A despolarização da membrana mitocondrial foi medida como uma diminuição na

fluorescência vermelha, como observado no controle positivo de CCCP (carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona), um rompedor conhecido da membrana mitocondrial. Para confirmar que JC-1 respondia às mudanças no potencial de membrana, 5 células B DHL-4 foram tratadas com duas concentrações de CCCP (50 μ M e 250 μ M) por 5 minutos a 37°C, CO₂ 5%. Um controle positivo adicional era formado por células tratadas com o inibidor de quinase de amplo espectro estaurosporina para induzir apoptose. Os resultados 10 mostrados na Fig. 56 são gráficos dot-plot de 10.000 contagens, com a fluorescência vermelha tabulada no eixo Y e a fluorescência verde tabulada no eixo X. Um resumo do histograma da percentagem de células com potencial da membrana mitocondrial rompida (MMP rompida: barras pretas) 15 é mostrado na Fig 56. Esses resultados demonstram que o tratamento com *scorpion* 20-4x20-4 ou com o *scorpion* 011x20 gerou uma diminuição no potencial da membrana mitocondrial associada à morte celular.

b. Fluxo de cálcio

20 *Scorpion* moléculas foram analisadas quanto às influências sobre as vias de sinalização celular, usando a mobilização de Ca⁺⁺, uma característica comum da sinalização celular, como uma medida desta.

Células de linfoma SU-DHL-6 foram marcadas com corante 25 Calco 4 e tratada com as moléculas de teste identificadas abaixo. As células foram lidas por 20 segundos para determinar a fluorescência de fundo, e depois foram adicionados SMIPs/*scorpions* (primeira linha pontilhada na Fig. 28), e a fluorescência foi medida em 600 segundos. Em 30 600 segundos, foi adicionado um excesso de 8 vezes de

F(ab)'₂ entrecruzado de cabra anti-humano, e a fluorescência foi medida por mais 300 segundos. O Pannel (A) da Fig. 28 mostra os resultados obtidos com uma combinação de SMIP de CD20 e SMIP de CD37 (linha vermelha);
 5 ou obtidos com um *scorpion* biespecífico CD20xCD37 (linha preta), comparadas com células não estimuladas (linha azul). No painel B da Fig. 28, os resultados do tratamento das células com SMIP de CD20 isoladamente (linha vermelha) resultou em mobilização de Ca⁺⁺, mas isso não foi tão
 10 robusto quanto o sinal gerado pelo *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 (linha preta). Os gráficos de mobilização de Ca⁺⁺ da Fig. 28 representam a fluorescência de poços em triplicata tratados com quantidades eqüimolares de *scorpion* e combinações de SMIP/SMIP.

15 c. Caspases 3, 7 e 9

A habilidade de *scorpions* de ligação de CD20 para matar diretamente células B, como evidenciado por coloração aumentada de Anexina V e iodeto de propídio e a perda de potencial da membrana mitocondrial levaram a uma
 20 investigação adicional de efeitos adicionais relacionados à apoptose de *scorpions* de ligação de CD20 em células B. A abordagem seguida foi a realização de ensaios de Apo-1 em células B DHL-4 expostas aos *scorpions* CD20xCD20 ou aos controles apropriado. O ensaio de Apo-1 se baseia em um
 25 substrato peptídico sintético para caspase 3 e 7. Os componentes do ensaio são disponíveis por Promega ("ApoONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay"). A clivagem mediada por Caspase do peptídeo marcado Z-DEVD-Rodamina 110 libera o marcador fluorescente de rodamina 110, o que é medido com o
 30 uso de uma excitação a 485 nm e uma detecção a 530 nm.

No experimento, 100 µl de células B DHL-4 (1×10^6 células/ml) foram plaqueadas em placas de cultura de tecido pretas de 96 poços de fundo achatado e tratadas por 24 ou 48 horas com 1 µg/ml de *scorpion* CD20xCD20, Rituximab, um anticorpo IgG de controle, ou 5 µM de estaurosporina a 37°C, CO₂ 5%, em uma incubadora padronizada de cultura de tecido (a estaurosporina é uma molécula pequena, um inibidor da proteína quinase de amplo espectro, que é conhecida na técnica como um indutor potente de apoptose clássica em vários tipos de células). Após 24 ou 48 horas, 100 µl do substrato diluído 100 vezes foram adicionados a cada poço, misturados gentilmente por um minuto em uma agitadora de placas (300 rpm), e incubados em temperatura ambiente por duas horas. A fluorescência foi medida com o uso de um filtro de excitação de 485 nM e um filtro de emissão de 527 nM (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems). Os gráficos que mostram a intensidade média de fluorescência de tratamentos em triplicata mais/menos desvio padrão após 24 horas e 48 horas (24 horas apenas para estaurosporina) são apresentados na Fig. 57. Esses resultados estabelecem que *scorpions* de ligação de CD20 não matam diretamente células B por uma via apoptótica que envolve ativação de caspase 3/7.

Os resultados obtidos no ensaio de Apo-1 foram confirmados por análises Western blot projetado para detectar a clivagem pró-caspase que resulta em caspase ativada ou para detectar clivagem de PARP (Poli (ADP-Ribose) Polimerase), uma proteína conhecida por ser clivada por caspase 3 ativada. As células B DHL-4 foram expostas a um *scorpion* de ligação de CD20 ou a um controle por 4, 24,

ou 48 horas, e os lisados de células foram fracionados em SDS-PAGE e *blotted* para análises *Western* com o uso de técnicas convencionais. A Fig. 58 apresenta os resultados na forma de uma coleção de *Western blots*. Os três *Westerns* inferiores utilizaram anticorpos anti-caspase para detectar mudanças do peso molecular da enzima caspase, refletindo ativação proteolítica. Para as caspases 3, 7 e 9, não houve evidências de ativação de caspase por qualquer uma das moléculas de ligação de CD20. A estaurosporina serviu como controle positivo para o ensaio, e induziu clivagem pró-caspase por caspase ativa para cada uma das caspases 3, 7 e 9. O quarto *Western* mostrado na Fig. 58 revela que PARP, um substrato conhecido de caspase 3 ativada, não foi clivado, consistente com a incapacidade de *scorpions* de ligação de CD20 para ativar caspase 3. Os resultados de todos esses experimentos são consistentes na comprovação de que a ativação de caspase 3 não é uma característica significativa da morte celular direta de células B DHL-4 induzida por *scorpions* de ligação de CD20.

Além disso, foi feito um estudo ao longo do tempo para determinar o efeito de proteínas de ligação de CD20, incluindo um *scorpion* CD20xCD20, sobre Caspase 3. Células B DoHH2 ou Su-DHL-6 foram incubadas com 10 nM de proteína de ligação de CD20 (*scorpion* S0129, SMIP 2Lm20-4 ou Rituxan) +/- Ig CD16 solúvel (40 nM), Ig CD16 solúvel isoladamente, ou meios. As células foram cultivadas em RPMI completo com FBS 10% a 3×10^5 /poço/300 μ l, e coletadas em 4 horas, 24 horas ou 72 horas. As amostras do ponto de tempo de 72 horas foram plaqueadas em 500 μ l do agente de teste. As células foram lavadas com PBS, e depois coradas para

caspase-3 intracelular ativa com o uso da Caspase 3 de BD Pharmingen, Forma Ativa, "mAB Apoptosis Kit:FITC" (Nº de Catálogo 55048, BD Pharmingen, San Jose, CA). Resumidamente, após 2 lavagens adicionais em PBS gelado, as

5 células foram suspensas em solução gelada de cytofix/cytoperm e incubadas no gelo por 20 minutos. As células foram então lavadas por centrifugação, aspiradas e lavadas duas vezes com tampão Perm/Wash em temperatura ambiente. As amostras foram então coradas com 20 µl de

10 FITC-anti-caspase 3 em 100 µl de tampão Perm-Wash em temperatura ambiente no escuro por trinta minutos. As amostras foram então lavadas duas vezes com tampão Perm-Wash, e ressuspensas em 500 µl de tampão Perm-Wash. As células lavadas foram então transferidas para tubos de FACs

15 e processadas em um FACs Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA) e analisadas com o software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). Os resultados são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16

Molécula (10 nM)	Percentagem de células Caspase 3-positivas			Percentagem em live gate		
	4 horas	24 horas	48 horas	4 horas	24 horas	48 horas
RTXN	7	25	7	75	53	56
e CD16 <i>hi</i> (4X)	27	47	21	79	60	43
SMIP de CD20 (2Lm20-4)	5	5	10	89	85	81
e CD16 <i>hi</i>	28	54	21	61	60	41

Scorpion CD20xCD20 humanizado (S00129)	7	13	14	69	68	61
e CD16 hi	30	31	15	67	75	72
Meios	7	5	9	89	82	80
e CD16 hi	6	5	9	91	83	80

Os resultados de todos esses experimentos são consistentes para mostrar que há uma ativação limitada de caspase 3 na ausência de CD16, o que não implica na ativação de caspase 3 como uma característica significativa da morte celular direta induzida por *scorpions* de ligação de CD20.

d. Fragmentação de DNA

A indução das vias clássicas de sinalização apoptótica em última análise resulta em condensação e degradação fragmentada do DNA cromossômico. Para determinar se *scorpions* de ligação de CD20 matam diretamente células B por meio de um mecanismo apoptótico clássico, o estado do DNA cromossômico da célula B foi examinado após exposição das células ao *scorpions* de ligação de CD20, ou a controles. Inicialmente, as células B DHL-4 foram tratadas *in vitro* por 4, 24 ou 48 horas com uma molécula de ligação de CD20, ou seja, o *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 (2Lm20-4x2Lm20-4), o *scorpion* CD20xCD20 (011x2Lm20-4) ou Rituximab, ou com um controle. Subseqüentemente, as células foram lisadas e o DNA cromossômico foi purificado com o uso de técnicas convencionais. O DNA cromossômico foi então tece seu tamanho fracionado por eletroforese em gel. O eletroforetograma em gel mostrado na Fig. 59 revela a

ausência de fragmentação de DNA que demonstrasse que a morte célula gerada por *scorpions* de ligação de CD20 não fosse mediada por uma via apoptótica clássica. Células tratadas com estaurosporina foram usadas como controle
5 positivo nesses ensaios.

e. Fosforilação de SYK

A SYK é uma proteína fosfo-regulada com vários sítios de fosforilação que funcionam como um repressor da transcrição. SYK está localizada no núcleo da célula, mas é
10 capaz de re-localização rápida na membrana mediante ativação. Para ativação, SYK deve reter sua sequência de localização nuclear. SYK ativada participa da supressão de tumores de câncer de mama, e SYK é ativada por sinais pró-apoptóticos como, por exemplo, radiação ionizante, ligação
15 de BCR e entrecruzamento da classe II do MHC. Além disso, foi demonstrado que SYK afeta as vias de PLC- γ e do Ca^{++} . Em função dessas observações, a capacidade de *scorpions* de ligação de CD20 afetar SYK foi investigada.

Células B DHL-6 foram expostas a um *scorpion*
20 biespecífico CD20xCD37 por 0, 5, 7 ou 15 horas, e as células foram lisadas. Os lisados foram imunoprecipitados com um anticorpo anti-fosfotirosina ou com um anticorpo anti-SYK. Os imunoprecipitados foram fracionados por eletroforese em gel, e os resultados são mostrados na Fig.
25 60. Fica evidente a partir da inspeção da Fig. 60 a incapacidade do *scorpion* biespecífico CD20xCD37 em induzir fosforilação de SYK, dessa forma, ativando-o. Consistente com os estudos descritos acima sobre ativação de caspase e fragmentação de DNA cromossômico, não parece que *scorpions*
30 de ligação de CD20 matem diretamente células B usando uma

via apoptótica clássica como, por exemplo, a via caspase dependente. Embora sem se fixar a uma teoria, espera-se que os *scorpions* de ligação de CD20 matem diretamente células B por meio de uma via independente de caspase e SYK que não
 5 apresenta significativamente fragmentação do DNA cromossômico, pelo menos não no mesmo intervalo de tempo em que a fragmentação ocorre durante a apoptose dependente de caspase.

Exemplo 19

10 Aplicações de *scorpions*

a. Atividade *in vivo* de *scorpions*

A atividade de *scorpions* também foi avaliada com a utilização de um modelo em camundongo.

As medidas da atividade de *scorpion in vivo* envolveram
 15 a administração de 10-300 µg de *scorpion* e subseqüentes determinações ao longo do tempo de concentrações séricas daquele *scorpion*. Os resultados desses estudos, apresentados como curvas da concentração sérica para cada um dos dois *scorpions* biespecíficos (ou seja, S0033, um
 20 *scorpion* CD20xCD27 e um *scorpion* CD20xCD37) a partir de estudos farmacocinéticos de três semanas em camundongos são apresentados na Fig. 40. Os dados na Fig. 40 mostram que leva pelo menos 500 horas após a administração antes que os níveis séricos de cada um dos dois *scorpions* biespecíficos
 25 retornem aos níveis basais. Dessa forma, *scorpions* apresentam estabilidade sérica e meias-vidas circulantes reprodutíveis e sustentadas *in vivo*.

A eficácia *in vivo* de *scorpions* também foi avaliada. Um modelo agressivo de xenoenxerto de Ramos foi usado em
 30 experimentos paralelos com SMIPs versus controles de

imunoglobulina históricas. As curvas de sobrevida fornecidas na Fig. 41 revelam que a administração de 10 µg de *scorpion* biespecífico teve uma influência desprezível sobre a sobrevida, mas a administração de 100-300 µg teve
5 um efeito positivo significativo sobre a sobrevida de camundongos que abrigam xenoenxertos de Ramos.

b. Terapias combinadas

É contemplado que *scorpions* terão aplicação na prevenção, tratamento ou atenuação de um sintoma de uma
10 ampla gama condições que afetam o homem, outros mamíferos e outros organismos. Por exemplo, espera-se que os *scorpions* de ligação de CD20 sejam úteis no tratamento ou na prevenção de diversas doenças associadas a células B excessivas ou aberrantes. Na verdade, qualquer doença
15 passível de um tratamento que envolva a eliminação de células B seria passível de tratamento com um *scorpion* de ligação de CD20. Além disso, *scorpions*, por exemplo, *scorpions* de ligação de CD20, podem ser usados em terapias combinadas com outras substâncias terapêuticas. Para
20 ilustrar a viabilidade de uma ampla gama de terapias combinadas, o *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 (S0129) foi administrado às células B Su-DHL-6 em combinação com doxorubicina, vincristina ou rapamicina. A doxorubicina é um veneno de topoisomerase II que interfere com a
25 bioquímica do DNA e pertence a uma classe de fármacos contemplada para tratamento anticâncer. A rapamicina (Sirolimus) é um antibiótico macrolídeo que inibe a iniciação da síntese protéica e suprime o sistema imunológico, sendo útil no transplante de órgãos e como
30 antiproliferativo usado com endopróteses (*stents*)

coronárias para inibir ou evitar a re-estenose. A vincristina é um alcalóide da vinca que inibe a formação de túbulos e tem sido usada para o tratamento de câncer.

Os resultados experimentais mostrados na Fig. 61 são
5 apresentados como valores do Índice de Combinação para cada
combinação ao longo de uma gama de níveis de efeitos. As
interações do *scorpion* monoespecífico CD20xCD20 S0129 são
diferentes para cada classe de fármaco, embora com Rituxan®
(RTXN) as formas dos gráficos sejam similares. O efeito
10 observado com doxorrubicina em concentrações elevadas pode
refletir uma mudança em direção à ligação monovalente. Os
dados estabelecem que *scorpions* de ligação de CD20 podem
ser usados em combinação com várias outras substâncias
terapêuticas, e estas combinações devem ficar evidentes
15 para aqueles habilitados na técnica à luz da presente
especificação.

Variações nos temas estruturais para moléculas de
ligação multivalentes com função efetora, ou *scorpions*,
ficarão evidentes para aqueles habilitados na técnica
20 mediante revisão da presente especificação, e essas
estruturas variantes estão dentro do escopo da invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Thompson et al.

5 <120> PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO MULTIVALENTES DE CADEIA SIMPLES COM FUNÇÃO EFETORA

<130> 30906/41393C

10 <160> 379

<170> PatentIn em versão 3.3

<210> 1

15 <211> 795

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

20 <223> Polinucleotídeo sintético

<220>

<223> anti-CD20 (2H7) LH (DNA)

25 <400> 1

atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60

agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120

30 gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag 180

ccaggatcct cccccaacc ctggatttat gcccatacca acctggcttc tggagtcctt 240

gctcgcttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300

35 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagtt ttaaccacc cacgttcggt 360

gctgggacca agctggagct gaaagatggc ggtggctcgg gcggtggtgg atctggagga 420

40 ggtgggagct ctcaggctta tctacagcag tctggggctg agtcggtgag gcctggggcc 480

tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacaa tatgcactgg 540

gtaaagcaga cacctagaca gggcctggaa tggattggag ctatttatcc aggaaatggt 600

45 gatacttcct acaatcagaa gttcaagggc aaggccacac tgactgtaga caaatcctcc 660

agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgaag actctgcggt ctatttctgt 720

50 gcaagagtgg tgtactatag taactcttac tggacttcg atgtctgggg cacagggacc 780

acggtcaccg tctct 795

55 <210> 2

<211> 265

<212> PRT

<213> Sequência artificial

60 <220>

<223> Polipeptídeo sintético

<220>
 <223> anti-CD20 (2H7) LH (AA)

5 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(22)
 <223> Líder

10 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (23)..(128)
 <223> VL

15 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (129)..(144)
 <223> Ligante

20 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (145)..(265)
 <223> VH

25 <400> 2

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

30 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

35 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

40 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

45 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

50 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
 145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 165 170 175

60 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 195 200 205
 5 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 225 230 235 240
 10 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255
 15 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 260 265
 <210> 3
 <211> 813
 <212> DNA
 20 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 25 <220>
 <223> anti-CD28 (2e12) LH (DNA)
 <400> 3
 30 atggattttc aagtgacagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
 agaggagtgc acattgtgct caccacatct ccagcttctt tggctgtgtc tctaggtcag 120
 agagccacca tctcctgcag agccagtgaag agtgttgaat attatgtcac aagtttaatg 180
 35 cagtgggtacc aacagaaacc aggacagcca cccaaactcc tcatctctgc tgcagcaaac 240
 gtagaatctg gggctcctgc cagggttagt ggcagtggtg ctgggacaga ctttagcctc 300
 aacatccatc ctgtggagga ggatgatatt gcaatgtatt tctgtcagca aagtaggaag 360
 40 gttccatgga cgttcggtgg aggcaccaag ctggaaatca aacggggtgg cgggtgatcc 420
 ggcggagggtg ggtcgggtgg cggcggatct caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc 480
 45 ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc 540
 ggctatgggtg taaactgggt tcgccagcct ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg 600
 atatgggggtg atggaagcac agactataat tcagctctca aatccagact atcgatcacc 660
 50 aaggacaact ccaagagcca agttttctta aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca 720
 gccagatact actgtgcccg agatgggttat agtaactttc attactatgt tatggactac 780
 55 tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tct 813
 <210> 4
 <211> 271
 <212> PRT
 60 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Polipeptideo sintético

5 <220>
 <223> anti-CD28 (2e12) LH (AA)

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(23)
 10 <223> Líder

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (24)..(135)
 15 <223> VL

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (136)..(150)
 20 <223> Ligante

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (151)..(271)
 25 <223> VH

<400> 4

30 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Val Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 20 25 30
 35

Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
 35 40 45

40 Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
 50 55 60

45 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn
 65 70 75 80

Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 85 90 95
 50

Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
 100 105 110

55 Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
 115 120 125

60 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

5 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly
 165 170 175
 10 Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly
 180 185 190
 15 Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp
 195 200 205
 20 Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser
 210 215 220
 25 Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
 225 230 235 240
 Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr
 245 250 255
 30 Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270
 35 <210> 5
 <211> 828
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 40 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 <220>
 <223> anti-CD28 (2e12) HL (DNA)
 45 <400> 5
 atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
 agaggagtcc aggtgcagct gaaggagtca ggacctggcc tgggtggcgcc ctcacagagc 120
 50 ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc tcattaaccg gctatggtgt aaactggggtt 180
 cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg ctgggaatga tatgggggtga tggaagcaca 240
 55 gactataatt cagctctcaa atccagacta tcgatcacca aggacaactc caagagccaa 300
 gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccagatacta ctgtgcccga 360
 gatgggtata gtaactttca ttactatggt atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 420
 60 accgtctcct ctgggggtgg aggctctggt ggcggtggat ccggcggagg tgggtcgggt 480

ggcgggggat ctgacattgt gctcacccaa tctccagctt ctttggctgt gtctctaggt 540
 5 cagagagcca ccatctcctg cagagccagt gaaagtgttg aatattatgt cacaagtta 600
 atgcagtggg accaacagaa accaggacag ccacccaaac tcctcatctc tgctgctagc 660
 aacgtagaat ctgggggtccc tgccaggttt agtggcagtg ggtctgggac agacttttagc 720
 10 ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg 780
 aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaacgt 828

15 <210> 6
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

20 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético

25 <220>
 <223> anti-CD28 (2e12) HL (AA)

30 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(23)
 <223> Líder

35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (24)..(144)
 <223> VH

40 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (145)..(164)
 <223> Ligante

45 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (165)..(276)
 <223> VL

<400> 6

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Val Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro
 20 25 30

Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
 35 40 45

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro
 50 55 60

5 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
 65 70 75 80
 Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn
 85 90 95
 10 Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
 100 105 110
 15 Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr
 115 120 125
 Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 20 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160
 25 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 165 170 175
 30 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 180 185 190
 35 Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 195 200 205
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
 210 215 220
 40 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
 225 230 235 240
 45 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
 245 250 255
 50 Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 260 265 270
 55 Glu Ile Lys Arg
 275
 60 <210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

5 <220>
 <223> GSP1 de Cadeia pesada

<400> 7
 aggtgctgga ggggacagtc actgagctgc 30

10

<210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 15 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

20 <220>
 <223> Cadeia Pesada aninhada

<400> 8
 gtcacwgtca ctgrctcagg gaartagc 28

25

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 30 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

35 <220>
 <223> Light Chain GSP1

<400> 9
 gggtgctgct catgctgtag gtgctgtctt tgc 33

40

<210> 10
 <211> 32
 <212> DNA
 45 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

50 <220>
 <223> Cadeia Leve aninhada

<400> 10
 caagaagcac acgactgagg cacctccaga tg 32

55

<210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 60 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

5 <220>
 <223> Iniciador de ancoragem de Raça reduzida
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (24)..(25)
 <223> n is a, c, g, or t

10 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (29)..(30)
 <223> n is a, c, g, or t

15 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (34)..(35)
 <223> n is a, c, g, or t

20 <400> 11
 ggccacgcgt cgactagtac gggnnngggnn gggnnng
 36

25 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

30 <220>
 <223> Iniciador sintético

35 <220>
 <223> T7 iniciador
 <400> 12
 gtaatacgac tcactatagg
 20

40 <210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

45 <220>
 <223> Iniciador sintético

50 <220>
 <223> M13 iniciador reverso
 <400> 13
 caggaaacag ctatgacc
 18

55 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <220>
 <223> Domínio de dobradiça de IgG1 humana

<400> 14
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 5 1 5 10 15

 <210> 15
 <211> 46
 10 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> hVK3L-F3H3
 15
 <400> 15
 gcgataaaagc ttgccgcat ggaagcacca gcgcagcttc tcttcc 46

 20 <210> 16
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 25 <220>
 <223> hVK3LF2

 <400> 16
 30 accagcgcag cttctcttcc tctgctact ctggctccca gataccaccg 50

 <210> 17
 <211> 45
 35 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> hVK3LF12HVL
 40
 <400> 17
 ggctcccaga taccaccggt caaattgttc tctccagtc tccag 45

 45 <210> 18
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 50 <220>
 <223> Iniciador sintético

 <220>
 <223> 2H7VHNheF
 55
 <400> 18
 gcgatagcta gccaggctta tctacagcag tctgg 35

 60 <210> 19
 <211> 43

<212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 5 <223> Iniciador sintético

 <220>
 <223> G4SNheR

 10 <400> 19
 gcgatagcta gccccacctc ctccagatcc accaccgccc gag 43

 <210> 20
 15 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 20 <223> Iniciador sintético

 <220>
 <223> 015VHXhoR

 25 <400> 20
 gcgtactcga ggagacggtg accgtggtcc ctgtg 35

 <210> 21
 30 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 35 <223> Iniciador sintético

 <220>
 <223> G1HC-Xho

 40 <400> 21
 gcagtctcga gcgagcccaa atcttgtgac aaaactc 37

 <210> 22
 45 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 50 <223> Iniciador sintético

 <220>
 <223> G1H-S-Xho

 55 <400> 22
 gcagtctcga gcgagcccaa atcttctgac aaaactc 37

 <210> 23
 60 <211> 36
 <212> DNA

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 5
 <220>
 <223> CH3REcoR1
 <400> 23
 10 gcgtgagaat tcttaccgag agacagggag aggctc 36
 <210> 24
 <211> 32
 15 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 20
 <220>
 <223> G1 XBZ-R
 <400> 24
 25 gcgacgtcta gagtcattta cccggagaca gg 32
 <210> 25
 <211> 54
 30 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 35
 <220>
 <223> G4SLinkR1-S
 <400> 25
 40 aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggag gaggtgggag tggg 54
 <210> 26
 <211> 54
 45 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 50
 <220>
 <223> G4SLinkR1-AS
 <400> 26
 55 aattccact cccacctcct ccagatccac caccgccga gccaccgcca ccat 54
 <210> 27
 <211> 36
 60 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

5 <220>
 <223> 2E12VLXbaR

<400> 27
 gcgtgtctag attaacgttt gatttcagc ttggtg 36

10

<210> 28
 <211> 35
 <212> DNA
 15 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

20 <220>
 <223> 2E12VLR1F

<400> 28
 gcgatgaatt ctgacattgt gctcacccaa tctcc 35

25

<210> 29
 <211> 34
 <212> DNA
 30 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

35 <220>
 <223> 2E12VHR1F

<400> 29
 gcgatgaatt ctcaggtgca gctgaaggag tcag 34

40

<210> 30
 <211> 37
 <212> DNA
 45 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

50 <220>
 <223> 2E12VHXbaR

<400> 30
 gcgagtctag attaagagga gacggtgact gaggttc 37

55

<210> 31
 <211> 27
 <212> DNA
 60 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

5 <220>
 <223> 2e12VHdXbaF1

<400> 31
 gggctctggag tggctgggaa tgatatg 27

10 <210> 32
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

15 <220>
 <223> Iniciador sintético

20 <220>
 <223> 2e12VHdXbaR1

<400> 32
 attcccagcc actccagacc ctttctcg 28

25 <210> 33
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

30 <220>
 <223> Iniciador sintético

35 <220>
 <223> IgBsrG1F

<400> 33
 gagaaccaca ggtgtacacc ctg 23

40 <210> 34
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

45 <220>
 <223> Iniciador sintético

50 <220>
 <223> IgBsrG1R

<400> 34
 gcagggtgta cacctgtggt tctcg 25

55 <210> 35
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

60 <220>

<223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> M13R
 5 <400> 35
 caggaaacag ctatgac 17
 10 <210> 36
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 15 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> M13F
 20 <400> 36
 gtaaaacgac ggccagtg 18
 25 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 30 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> T7
 35 <400> 37
 gtaatacgac tcactatagg 20
 40 <210> 38
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 45 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> pD18F-17
 50 <400> 38
 aactagagaa cccactg 17
 55 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 60 <220>
 <223> Iniciador sintético

	<220>		
	<223>	pD18F-20	
5	<400>	39	
		gctaactaga gaaccactg	20
10	<210>	40	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	Sequência artificial	
15	<220>		
	<223>	Iniciador sintético	
	<220>		
	<223>	pD18F-1	
20	<400>	40	
		atacgactca ctataggg	18
25	<210>	41	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	Sequência artificial	
30	<220>		
	<223>	Iniciador sintético	
	<220>		
	<223>	pD18R-s	
35	<400>	41	
		gctctagcat ttaggtgac	19
40	<210>	42	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	Sequência artificial	
45	<220>		
	<223>	Iniciador sintético	
	<220>		
	<223>	CH3seqF1	
50	<400>	42	
		catgaggctc tgcacaac	18
55	<210>	43	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	Sequência artificial	
60	<220>		
	<223>	Iniciador sintético	

<220>
 <223> CH3seqF2

 <400> 43
 5 cctctacagc aagctcac 18

 <210> 44
 <211> 19
 10 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético
 15
 <220>
 <223> CH3seqR1

 <400> 44
 20 gggttcttggt cagctcatc 19

 <210> 45
 <211> 18
 25 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético
 30
 <220>
 <223> CH3seqR2

 <400> 45
 35 gtgagcttgc tgtagagg 18

 <210> 46
 <211> 51
 40 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético
 45
 <220>
 <223> L1-11R

 <400> 46
 50 gcgatagaat tcccagatcc accaccgccc gagccaccgc caccataatt c 51

 <210> 47
 <211> 36
 55 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético
 60
 <220>

<223> L1-6R
 <400> 47
 5 gcgatagaat tcccagagcc accgccacca taattc 36
 <210> 48
 <211> 45
 <212> DNA
 10 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 15 <220>
 <223> L3R
 <400> 48
 20 gcgtatgaat tccccgagcc accgccaccc ttaccggag acagg 45
 <210> 49
 <211> 49
 <212> DNA
 25 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 30 <220>
 <223> L4R
 <400> 49
 35 gcgtatgaat tcccagatcc accaccgcc gagccaccgc cacccttac 49
 <210> 50
 <211> 44
 <212> DNA
 40 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 45 <220>
 <223> L5R
 <400> 50
 50 gcgtatgaat tcccgtgcc tcctcccca gatccaccac cgcc 44
 <210> 51
 <211> 23
 <212> DNA
 55 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 60 <220>
 <223> IgBsrG1F

<400> 51
 gagaaccaca ggtgtacacc ctg 23
 5
 <210> 52
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 10
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 15
 <220>
 <223> L-CPPCPR
 <400> 52
 gcgatagaat tcggacaagg tggacacccc ttacccggag acagggagag 50
 20
 <210> 53
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 25
 <220>
 <223> G281LH-NheR
 <220>
 30 <223> Iniciador sintético
 <400> 53
 actgctgcag ctggaccgcg ctagctccgc cgccaccga c 41
 35
 <210> 54
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 40
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 45 <223> G281LH-NheF
 <400> 54
 ggcggagcta gcgcggtcca gctgcagcag tctggacctg 40
 50
 <210> 55
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 55
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 60 <223> G281-LH-LPinF

<400> 55
 gcgatcaccg gtgacatcca gatgactcag tctccag 37

5 <210> 56
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

10 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> G281-LH-HXhoR

15 <400> 56
 gcgatactcg aggagacggt gactgagggt ccttgac 37

20 <210> 57
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

25 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> G281-LH-LEcoF

30 <400> 57
 gcgatcgaat tcagacatcc agatgactca gtctccag 38

35 <210> 58
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

40 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> G281-LH-HXbaR

45 <400> 58
 gcgattctag attaggaaga gacggtgact gaggttcctt gac 43

50 <210> 59
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

55 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> G281-HL-HF

60 <400> 59

gcgataaccg gtgcggtcca gctgcagcag tctggac 37

5 <210> 60
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

10 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> G281-HL-HR3

15 <400> 60
 gacccaccac cgcccagagcc accgccacca gaagagacgg tgactgaggt tc 52

20 <210> 61
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

25 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> G281-HL-HR2

30 <400> 61
 actcccgct cctctgate cgccgccacc cgaccacca cggcccag 49

35 <210> 62
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

40 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> G281-HL-HNheR

45 <400> 62
 gagtcacatg gatgtcgcta gcactccgc ctctcctga tc 42

50 <210> 63
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

55 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> G281-HL-LNheF

60 <400> 63
 atcaggagga ggcgggagtg ctagcgacat ccagatgact cagtc 45

5 <210> 64
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético
 10 <220>
 <223> G281-HL-LXhoR

 <400> 64
 15 gcgataactcg agcctttgat ctccagttcg gtgcctc 37

 <210> 65
 <211> 42
 20 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético
 25 <220>
 <223> G281-HL-LXhoR

 <400> 65
 30 gcgatatacta gactcaacct ttgatctcca gttegggtgcc tc 42

 <210> 66
 <211> 37
 35 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético
 40 <220>
 <223> G281-HL-EcoF

 <400> 66
 45 gcgatagaat tcgcgggtcca gctgcagcag tctggac 37

 <210> 67
 <211> 40
 50 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético
 55 <220>
 <223> 194-LH-LF1

 <400> 67
 60 gcgtatgaac cggtgacatc cagatgacac agactacatc 40

```

    <210> 68
    <211> 50
    <212> DNA
5   <213> Sequência artificial

    <220>
    <223> Iniciador sintético

10  <220>
    <223> 194-LF2

    <400> 68
15  atccagatga cacagactac atcctccctg tctgcctctc tgggagacag          50

    <210> 69
    <211> 52
    <212> DNA
20  <213> Sequência artificial

    <220>
    <223> Iniciador sintético

25  <220>
    <223> 194-LF3

    <400> 69
30  gtctgcctct ctgggagaca gagtcaccat cagttgcagg gcaagtcagg ac          52

    <210> 70
    <211> 50
35  <212> DNA
    <213> Sequência artificial

    <220>
    <223> Iniciador sintético

40  <220>
    <223> 194-LF4

    <400> 70
45  gttgcagggc aagtcaggac attcgcaatt atttaaactg gtatcagcag          50

    <210> 71
    <211> 50
50  <212> DNA
    <213> Sequência artificial

    <220>
    <223> Iniciador sintético

55  <220>
    <223> 194-LF5

    <400> 71
60  atttaaactg gtatcagcag aaaccagatg gaactgttaa actcctgac          50

```

<210> 72
 <211> 50
 <212> DNA
 5 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético

 10 <220>
 <223> 194-LF6

 <400> 72
 15 gaactgttaa actcctgac tactacacat caagattaca ctcaggagtc 50

 <210> 73
 <211> 52
 <212> DNA
 20 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético

 25 <220>
 <223> 194-LF7

 <400> 73
 30 caagattaca ctcaggagtc ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga ac 52

 <210> 74
 <211> 52
 <212> DNA
 35 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético

 40 <220>
 <223> 194-LR7

 <400> 74
 45 caggttggca atggtgagag aataatctgt tccagacca ctgccactga ac 52

 <210> 75
 <211> 50
 <212> DNA
 50 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético

 55 <220>
 <223> 194-LR6

 <400> 75
 60 gcaaaagtaa gtggcaatat cttctggttg caggttggca atggtgagag 50

<210> 76
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 5
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 10 <223> 194-LR5
 <400> 76
 gaacgtccac ggaagcgtat taccctggtg gcaaaagtaa gtggcaatat c 51
 15
 <210> 77
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 20
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 25 <223> 194-LR4
 <400> 77
 cgtttggtta ccagtttggt gcctccaccg aacgtccacg gaagcgtatt ac 52
 30
 <210> 78
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 35
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 40 <223> 194-LR3
 <400> 78
 accaccgcc gagccaccgc caccctgttt ggttaccagt ttggtg 46
 45
 <210> 79
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 50
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 55 <223> 194-LR2
 <400> 79
 gctagcgtc ccacctctc cagateccac accgcccag ccaccgccac 50
 60
 <210> 80

<211> 42
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

5 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> 194-LH-LR1

10 <400> 80
 gttgcagctg gacctcgcta gcgctccac ctctccaga tc 42

15 <210> 81
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

20 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> 194-LH-HF1

25 <400> 81
 gatctggagg aggtgggagc gctagcgagg tccagctgca acagtctgga cctg 54

30 <210> 82
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

35 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> 194-HF2

40 <400> 82
 agctgcaaca gtctggacct gaactggtga agcctggagc ttcaatgaag 50

45 <210> 83
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

50 <220>
 <223> Iniciador sintético

<220>
 <223> 194-HF3

55 <400> 83
 agcctggagc ttcaatgaag atttctgca aggcctctgg ttactcattc 50

60 <210> 84
 <211> 53

<212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 5 <223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> 194-HF4
 10 <400> 84
 gcaaggcctc tggttactca ttactggct acatcgtgaa ctggctgaag cag 53
 <210> 85
 15 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 20 <223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> 194-HF5
 25 <400> 85
 atcgtgaact ggctgaagca gagccatgga aagaaccttg agtggattgg ac 52
 <210> 86
 30 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 35 <223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> 194-HF6
 40 <400> 86
 gaaccttgag tggattggac ttattaatcc atacaaaggt cttactacct ac 52
 <210> 87
 45 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 50 <223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> 194-HR6
 55 <400> 87
 aatgtggcct tggccttgaa tttctggttg taggtagtaa gacctttgta tg 52
 <210> 88
 60 <211> 52
 <212> DNA

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 5
 <220>
 <223> 194-HR5
 <400> 88
 10 catgtaggct gtgctggatg acttgtctac agttaatgtg gccttgccct tg 52
 <210> 89
 <211> 55
 15 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 20
 <220>
 <223> 194-HR4
 <400> 89
 25 actgcagagt cttcagatgt cagactgagg agctccatgt aggctgtgct ggatg 55
 <210> 90
 <211> 52
 30 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 35
 <220>
 <223> 194-HR3
 <400> 90
 40 accatagtac ccagatcttg cacagtaata gactgcagag tcttcagatg tc 52
 <210> 91
 <211> 52
 45 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 50
 <220>
 <223> 194-HR2
 <400> 91
 55 gcgccccaga catcgaagta ccagtcgag tcaccatagt acccagatct tg 52
 <210> 92
 <211> 52
 60 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

5 <220>
 <223> 194-LH-HR1

<400> 92
 gcgaataactc gaggagacgg tgaccgtggt ccctgcgccc cagacatcga ag 52

10

<210> 93
 <211> 42
 <212> DNA
 15 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

20 <220>
 <223> 194-HL-HF1

<400> 93
 gcgtatgaac cggtagggtc cagctgcaac agtctggacc tg 42

25

<210> 94
 <211> 55
 <212> DNA
 30 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

35 <220>
 <223> 194-HL-HR1

<400> 94
 accgccacca gaggagacgg tgaccgtggt ccctgcgccc cagacatcga agtac 55

40

<210> 95
 <211> 52
 <212> DNA
 45 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador sintético

50 <220>
 <223> 194-HL-HR0

<400> 95
 acctcctcca gatccaccac cgcccagacc accgccacca gaggagacgg tg 52

55

<210> 96
 <211> 49
 <212> DNA
 60 <213> Sequência artificial

```

    <220>
    <223> Iniciador sintético

5    <220>
    <223> 194-HL-LF1

    <400> 96
    gcgggggagg tggcagtgt agcgacatcc agatgacaca gactacatc 49

10
    <210> 97
    <211> 34
    <212> DNA
    <213> Sequência artificial

15
    <220>
    <223> Iniciador sintético

    <220>
20    <223> 194-HL-LR3Xho

    <400> 97
    gcgaatactc gagcggttgg ttaccagttt ggtg 34

25
    <210> 98
    <211> 37
    <212> DNA
    <213> Sequência artificial

30
    <220>
    <223> Iniciador sintético

    <220>
35    <223> 194-HL-LR3Xba

    <400> 98
    gcgatatacta gattaccgtt tggttaccag tttggtg 37

40
    <210> 99
    <211> 43
    <212> DNA
    <213> Sequência artificial

45
    <220>
    <223> Iniciador sintético

    <220>
50    <223> 194-HL-HF1R1

    <400> 99
    gcgtatgaga attcagaggt ccagctgcaa cagtctggac ctg 43

55
    <210> 100
    <211> 41
    <212> DNA
    <213> Sequência artificial

60
    <220>

```

	<223>	Iniciador sintético	
	<220>		
	<223>	194-LH-LF1R1	
5	<400>	100	
		gcgtatgaga attctgacat ccagatgaca cagactacat c	41
10	<210>	101	
	<211>	54	
	<212>	DNA	
	<213>	Sequência artificial	
15	<220>		
	<223>	Iniciador sintético	
	<220>		
	<223>	194-LH-HR1Xba	
20	<400>	101	
		gcgtatctag attaggagac ggtgaccgtg gtcctcgcg cccagacatc gaag	54
25	<210>	102	
	<211>	725	
	<212>	DNA	
	<213>	Sequência artificial	
30	<220>		
	<223>	Polinucleotídeo sintético	
	<220>		
	<223>	G28-1 VLVH (DNA)	
35	<400>	102	
		accggtgaca tccagatgac tcagtctcca gcctccctat ctgcatctgt gggagagact	60
		gtcaccatca catgtcgaaac aagtgaaaat gtttacagtt atttggttg gtatcagcag	120
40		aaacagggaa aatctcctca gctcctggtc tcttttgcaa aaaccttagc agaaggtgtg	180
		ccatcaaggt tcagtggcag tggatcaggc acacagtttt ctctgaagat cagcagcctg	240
45		cagcctgaag attctggaag ttatttctgt caacatcatt ccgataatcc gtggacgttc	300
		ggtggaggca ccgaactgga gatcaaaggt ggcggtggct cgggcggtgg tgggtcgggt	360
		ggcggcggat ctgctagcgc agtccagctg cagcagtctg gacctgagct ggaaaagcct	420
50		ggcgcttcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggttact cattcactgg ctacaatatg	480
		aactgggtga agcagaataa tggaaagagc cttgagtgga ttggaaatat tgatccttat	540
55		tatggtggta ctacctacaa ccggaagttc aagggcaagg ccacattgac tgtagacaaa	600
		tcctccagca cagcctacat gcagctcaag agtctgacat ctgaggactc tgcagtctat	660
		tactgtgcaa gatcggtcgg ccctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc	720
60		tcgag	725

5 <210> 103
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 10 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético

 15 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(107)
 <223> VL

 20 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (108)..(124)
 <223> Ligante

 25 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (125)..(239)
 <223> VH

 30 <400> 103
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 35 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30

 40 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

 45 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 50 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 55 Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95

 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

 60 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ala Val Gln Leu
 115 120 125

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile
 130 135 140

5 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp
 145 150 155 160

10 Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp
 165 170 175

15 Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala
 180 185 190

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys
 195 200 205

20 Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val
 210 215 220

25 Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 225 230 235

30 <210> 104
 <211> 767
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

35 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

<220>
 <223> G28-1 VHVL (DNA)

40 <400> 104
 accggtgagg tccagctgca acagtctgga cctgaactgg tgaagcctgg agcttcaatg 60
 aagatttcct gcaaggcctc tggttactca ttactggct acatcgtgaa ctggctgaag 120

45 cagagccatg gaaagaacct tgagtggatt ggacttatta atccatacaa aggtcttact 180
 acctacaacc agaaattcaa gggcaaggcc acattaactg tagacaagtc atccagcaca 240
 gcctacatgg agtcctcag tctgacatct gaagactctg cagtctatta ctgtgcaaga 300

50 tctgggtact atggtgactc ggactggtac ttcatgtct ggggcgcagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ctggtggcgg tggctcgggc ggtggtggat ctggaggagg tgggagcggg 420

55 ggaggtggca gtgctagcga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct 480
 ctgggagaca gagtcccat cagttgcagg gcaagtcagg acattcgcaa ttatttaaac 540
 tggatcagc agaaaccaga tggaaactgt aaactcctga tctactacac atcaagatta 600

60 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc 660

attgccaacc tgcaaccaga agatattgcc acttactttt gccaacaggg taatacgctt 720
 ccgtggacgt tcggtggagg caccaaactg gtaaccaaac gctcgag 767

5

<210> 105
 <211> 253
 <212> PRT
 10 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Polipeptídeo sintético

15 <220>
 <223> G28-1 VHVL (AA)

<220>
 <221> misc_característica
 20 <222> (1)..(121)
 <223> VH

<220>
 <221> misc_característica
 25 <222> (122)..(144)
 <223> Ligante

<220>
 <221> misc_característica
 30 <222> (145)..(253)
 <223> VL

<400> 105

35 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 40 20 25 30

Ile Val Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 45 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

50 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

55 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

60 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

5

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser
 130 135 140

10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 145 150 155 160

15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 165 170 175

20

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 180 185 190

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 195 200 205

25

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gln Pro
 210 215 220

30

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 225 230 235 240

35

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg Ser
 245 250

40

<210> 106
 <211> 749
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

45

<220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

<220>
 <223> G19-4 VLVH (DNA)

50

<400> 106
 accggtgaca tccagatgac acagactaca tctccctgt ctgcctctct gggagacaga 60
 gtcaccatca gttgcagggc aagtcaggac attcgcaatt atttaaactg gtatcagcag 120
 aaaccagatg gaactgttaa actcctgatc tactacacat caagattaca ctcaggagtc 180
 ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagattatt ctctcaccat tgccaacctg 240
 caaccagaag atattgccac ttacttttgc caacagggta atacgcttcc gtggacgttc 300
 ggtggaggca ccaaactggt aaccaaacgg ggtggcggtg gtcggggcgg tggtgatct 360

```

ggaggagggtg ggagcgctag cgagggtccag ctgcaacagt ctggacctga actggtgaag 420
cctggagagctt caatgaagat ttcttgaag gcctctgggtt actcattcac tggctacatc 480
5  gtgaactggc tgaagcagag ccatggaaag aaccttgagt ggattggact tattaatcca 540
tacaaaggtc ttactaccta caaccagaaa ttcaaggga aggccacatt aactgtagac 600
aagtcacca gcacagccta catggagctc ctgagctctga catctgaaga ctctgcagtc 660
10  tattactgtg caagatctgg gtactatggt gactcggact ggtacttcga tgtctggggc 720
gcagggacca cggtcaccgt ctctctgag 749

15  <210> 107
    <211> 247
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial
20  <220>
    <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
25  <223> G-19-4 VLVH (AA)

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(108)
30  <223> VL

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (109)..(125)
35  <223> Ligante

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (126)..(247)
40  <223> VH

    <400> 107

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
45  1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
50  20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

55  Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

60  Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80

```


	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp	
	85 90 95	
5		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg Gly Gly Gly Gly	
	100 105 110	
10		
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Val Gln	
	115 120 125	
15		
	Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys	
	130 135 140	
20		
	Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Ile Val Asn	
	145 150 155 160	
25		
	Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile	
	165 170 175	
30		
	Asn Pro Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys	
	180 185 190	
35		
	Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu	
	195 200 205	
40		
	Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser	
	210 215 220	
45		
	Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly	
	225 230 235 240	
50		
	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	245	
55		
	<210> 108	
	<211> 752	
	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
60		
	<220>	
	<223> Polinucleotídeo sintético	
65		
	<220>	
	<223> G19-4 VHVL (DNA)	
70		
	<400> 108	
	accggtgagg tccagctgca acagtctgga cctgaactgg tgaagcctgg agcttcaatg	60
75		
	aagatttcct gcaaggcctc tggttactca ttcaactggct acatcgtgaa ctggctgaa	120

```

cagagccatg gaaagaacct tgagtggatt ggacttatta atccatacaa aggtcttact 180
acctacaacc agaaattcaa gggcaaggcc acattaactg tagacaagtc atccagcaca 240
5 gcctacatgg agctcctcag tctgacatct gaagactctg cagtctatta ctgtgcaaga 300
tctgggtact atggtgactc ggactgggtac ttgatgtctt ggggcgcagg gaccacggtc 360
10 accgtctcct ctggtggcgg tggctcgggc ggtggtggat ctggaggagg tgggagcgt 420
agcgacatcc agatgacaca gactacatcc tccctgtctg cctctctggg agacagagtc 480
accatcagtt gcagggcaag tcaggacatt cgcaattatt taaactggta tcagcagaaa 540
15 ccagatggaa ctgttaaaact cctgatctac tacacatcaa gattacactc aggagtccca 600
tcaaggttca gtggcagtgg gtctggaaca gattattctc tcaccattgc caacctgcaa 660
20 ccagaagata ttgccactta cttttgccaa cagggttaata cgcttccgtg gacgttcggt 720
ggaggcacca aactggtaac caaacgctcg ag 752

```

```

25 <210> 109
    <211> 248
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial

```

```

30 <220>
    <223> Polipeptídeo sintético

```

```

    <220>
    <223> G19-4 VHVL (AA)

```

```

35 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(122)
    <223> VH

```

```

40 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (123)..(139)
    <223> Ligante

```

```

45 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (140)..(248)
    <223> VL

```

```

50 <400> 109

```

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15

```

```

55 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
    20           25           30

```

```

60 Ile Val Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile

```

	35	40	45
5	Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe 50 55 60		
	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
10	Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
15	Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp 100 105 110		
20	Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 115 120 125		
25	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr 130 135 140		
	Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile 145 150 155 160		
30	Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln 165 170 175		
35	Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg 180 185 190		
40	Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr 195 200 205		
45	Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr 210 215 220		
	Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly 225 230 235 240		
50	Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg Ser 245		
55	<210> 110 <211> 45 <212> DNA <213> Sequência artificial		
60	<220> <223> Iniciador sintético		

<220>
 <221> misc_característica
 <223> ssc(s)-hIgG1 (DNA)
 5
 <400> 110
 gagcccaaatt cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gctca 45
 <210> 111
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 15 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 <221> misc_característica
 20 <223> ssc(s)-hIgG1 (AA)
 <400> 111
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Ser
 25 1 5 10 15
 <210> 112
 <211> 45
 30 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 35
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> scc(s)-hIgG1 (DNA)
 40 <400> 112
 gagcccaaatt cttctgacaa aactcacaca tgtccaccgt gctca 45
 <210> 113
 45 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 50 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 <221> misc_característica
 55 <223> scc(s)-hIgG1 (AA)
 <400> 113
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Ser
 60 1 5 10 15

<210> 114
 <211> 45
 <212> DNA
 5 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético

 10
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> css(s)-hIgG1 (DNA)

 15 <400> 114
 gagcccaaattttgtgacaa aactcacaca tctccaccga gctca 45

 <210> 115
 20 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 25 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 <221> misc_característica
 <223> css(s)-hIgG1 (AA)
 30
 <400> 115

 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 35

 <210> 116
 <211> 45
 <212> DNA
 40 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

 45
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> scs(s)-hIgG1 (DNA)

 50 <400> 116
 gagcccaaattttgtgacaa aactcacaca tgtccaccga gctca 45

 <210> 117
 55 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 60 <223> Peptídeo sintético

```

<220>
<221> misc_característica
<223> scs(s)-hIgG1 (AA)

5 <400> 117

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Ser
1          5          10          15

10
<210> 118
<211> 45
<212> DNA
<213> Sequência artificial

15
<220>
<223> Iniciador sintético

20 <400> 118
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgtccaccgt gctca 45

<210> 119
25 <211> 15
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
30 <223> Peptídeo sintético

<400> 119

35 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Ser
1          5          10          15

<210> 120
40 <211> 45
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
45 <223> Iniciador sintético

<400> 120
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgtccaccgt gccca 45

50

<210> 121
<211> 15
<212> PRT
55 <213> Sequência artificial

<220>
<223> Peptídeo sintético

60
<400> 121

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

5
 <210> 122
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

10
 <220>
 <223> Iniciador sintético

15
 <400> 122
 gagcccaaatt cttctgacaa aactcacaca tctccaccga gccca 45

20
 <210> 123
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

25
 <220>
 <223> Peptídeo sintético

30
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro
 1 5 10 15

35
 <210> 124
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

40
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> csc(p)-hIgG1 (DNA)

45
 <400> 124
 gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tctccaccgt gccca 45

50
 <210> 125
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

55
 <220>
 <223> Peptídeo sintético

60
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> csc(p)-hIgG1 (AA)

<400> 125

```

      Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro
      1           5           10           15
5
  <210> 126
  <211> 45
  <212> DNA
  <213> Sequência artificial
10
  <220>
  <223> Iniciador sintético

15
  <220>
  <221> misc_característica
  <223> ssc(p)-hIgG1 (DNA)

20 <400> 126
    gagcccaaatt cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gccca           45

  <210> 127
25 <211> 15
  <212> PRT
  <213> Sequência artificial

  <220>
30 <223> Peptídeo sintético

  <220>
  <221> misc_característica
  <223> ssc(p)-hIgG1 (AA)
35
  <400> 127

      Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro
      1           5           10           15
40
  <210> 128
  <211> 45
  <212> DNA
45 <213> Sequência artificial

  <220>
  <223> Iniciador sintético

50
  <220>
  <221> misc_característica
  <223> scc(p)-hIgG1 (DNA)

  <400> 128
55 gagcccaaatt cttctgacaa aactcacaca tgtccaccgt gccca           45

  <210> 129
  <211> 15
60 <212> PRT
  <213> Sequência artificial

```



```

    <220>
    <223> Peptídeo sintético

5    <220>
    <221> misc_característica
    <223> scc(p)-hIgG1 (AA)

    <400> 129

10   Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
      1          5          10          15

15   <210> 130
    <211> 45
    <212> DNA
    <213> Sequência artificial

20   <220>
    <223> Iniciador sintético

    <220>
    <221> misc_característica
25   <223> css(p)-hIgG1 (DNA)

    <400> 130
    gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tctccaccga gccca
                                                                45

30   <210> 131
    <211> 15
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial

35   <220>
    <223> Peptídeo sintético

    <220>
40   <221> misc_característica
    <223> css(p)-hIgG1 (AA)

    <400> 131

45   Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro
      1          5          10          15

    <210> 132
50   <211> 45
    <212> DNA
    <213> Sequência artificial

    <220>
55   <223> Iniciador sintético

    <220>
    <221> misc_característica
    <223> ssc(p)-hIgG1 (DNA)

60   <400> 132

```

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgtccaccga gccca

45

5 <210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

10 <220>
 <223> Peptídeo sintético

<220>
 <221> misc_característica
 <223> ssc(p)-hIgG1 (DNA)

15 <400> 133

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro
 1 5 10 15

20 <210> 134
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

25 <220>
 <221> misc_característica
 <223> ssc(p) (DNA)

30 <220>
 <223> Iniciador sintético

<400> 134
 agttgtccac cgtgccca

18

35 <210> 135
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Peptídeo sintético

45 <400> 135

Ser Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5

50 <210> 136
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

55 <220>
 <223> Iniciador sintético

60 <400> 136
 tgatcag

7

```

    <210> 137
    <211> 2
    <212> PRT
5    <213> Sequência artificial

    <220>
    <223> Peptídeo sintético

10   <400> 137

    Asp Gln
    1

15   <210> 138
    <211> 7
    <212> DNA
    <213> Sequência artificial

20   <220>
    <223> Iniciador sintético

    <400> 138
25   ctcgagt 7

    <210> 139
    <211> 2
    <212> PRT
30   <213> Sequência artificial

    <220>
    <223> Peptídeo sintético

35   <400> 139

    Ser Ser
    1

40   <210> 140
    <211> 654
    <212> DNA
45   <213> Homo sapiens

    <220>
    <223> hIgG1 do tipo selvagem

50   <400> 140
    gcacctgaac tcctgggtgg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 60

    ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtgg tggacgtgag ccacgaagac 120

55   cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180

    ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtctcac cgtcctgcac 240

    caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 300

60   cccatcgaga aaacaatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 360

```

```

ctgcccccat ccggggatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 420
ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 480
5 tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 540
accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 600
10 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 654

```

```

<210> 141
<211> 217
15 <212> PRT
    <213> Homo sapiens

```

```

<220>
<223> hIgG1 do tipo selvagem
20 <400> 141

```

```

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1          5          10          15
25

```

```

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
          20          25          30
30

```

```

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
          35          40          45
35

```

```

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
          50          55          60
35

```

```

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65          70          75          80
40

```

```

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
          85          90          95
45

```

```

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
          100          105          110
50

```

```

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
          115          120          125
50

```

```

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
          130          135          140
55

```

```

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145          150          155          160
60

```

```

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
      165                      170                      175

5  Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
      180                      185                      190

10 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
      195                      200                      205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
15      210                      215

<210> 142
<211> 654
<212> DNA
20 <213> Homo sapiens

<220>
<223> hIgG1 (P238S)

25 <400> 142
    gcacctgaac tctgtgggtgg atcgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc      60
    ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtgg tggacgtgag ccacgaagac      120
30 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag      180
    ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac      240
    caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc      300
35 cccatcgaga aaacaatctc caaagccaaa ggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc      360
    ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa      420
40 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac      480
    tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc      540
    accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag      600
45 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga      654

<210> 143
50 <211> 217
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

<220>
55 <223> hIgG1 (P238S)

<400> 143

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
60 1                      5                      10                      15

```

```

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

<210> 144
<211> 654
55 <212> DNA
    <213> Homo sapiens

<220>
<223> hIgG1 (P331S)
60
<400> 144

```

gcacctgaac tectgggtgg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 60
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgctgggtgg tggacgtgag ccacgaagac 120
 5 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180
 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 240
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc 300
 10 tccatcgaga aaacaatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 360
 ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 420
 15 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 480
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc 540
 accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 600
 20 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 654

<210> 145
 25 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 30 <223> hIgG1 (P331S)

<400> 145
 35 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 40 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 45 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 50 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 55 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 60 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

	115	120	125	
5	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	130	135	140	
10	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	145	150	155	160
	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
		165	170	175
15	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
		180	185	190
20	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
		195	200	205
25	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	210	215		
30	<210> 146			
	<211> 654			
	<212> DNA			
	<213> Homo sapiens			
35	<220>			
	<223> hIgG1 (P238S/P331S)			
	<400> 146			
	gcacctgaac tcctgggtgg atcgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	60		
40	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac	120		
	cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	180		
	ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	240		
45	caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc	300		
	tccatcgaga aaacaatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	360		
50	ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa	420		
	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	480		
	tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc	540		
55	accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	600		
	gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga	654		
60	<210> 147			
	<211> 217			


```

<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<220>
5  <223>  hIgG1 (P238S/P331S)

<400>  147

10  Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
    1          5          10          15

    Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    20          25          30

15  Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
    35          40          45

    Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50          55          60

20  Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
    65          70          75          80

    Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
    85          90          95

    Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    100          105          110

35  Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
    115          120          125

    Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130          135          140

40  Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
    145          150          155          160

    Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
    165          170          175

    Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
    180          185          190

55  Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
    195          200          205

    Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210          215
60

```

5 <210> 148
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 10 <220>
 <223> Iniciador sintético

 <220>
 <223> STD1 (DNA)

 15 <400> 148
 aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggag gaggtgggag tgggaattct 60

 20 <210> 149
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 25 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 <223> STD1 (AA)

 30 <400> 149
 Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

 35 Ser Gly Asn Ser
 20

 40 <210> 150
 <211> 114
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 45 <220>
 <223> Iniciador sintético

 50 <220>
 <223> STD2 (DNA)

 <400> 150
 aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggag gaggtgggag tgggaattat 60

 55 ggtggcggtg gctcgggcgg tgggtggatct ggaggaggtg ggagtgggaa ttct 114

 60 <210> 151
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Peptídeo sintético
 5
 <220>
 <223> STD2 (AA)
 <400> 151
 10 Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 15 Ser Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Asn Ser
 20 35
 <210> 152
 <211> 6
 25 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 30 <220>
 <223> Ligante H1 (PN)
 <400> 152
 35 aattct 6
 <210> 153
 <211> 2
 40 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 45 <220>
 <223> Ligante H1 (AA)
 50 <400> 153
 Asn Ser
 1
 55 <210> 154
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 60 <220>

<223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> Ligante H2 (PN)
 5 <400> 154
 ggtggcggtg gctcggggaa ttct 24
 10 <210> 155
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 15 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> Ligante H2 (AA)
 20 <400> 155
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser
 25 1 5
 <210> 156
 <211> 30
 30 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador sintético
 35 <220>
 <223> Ligante H3 (PN)
 <400> 156
 40 aattatggtg gcggtggctc tgggaattct
 <210> 157
 <211> 10
 45 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 50 <220>
 <223> Ligante H3 (AA)
 <400> 157
 55 Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser
 1 5 10
 60 <210> 158
 <211> 39

<212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 5 <223> Iniciador sintético

 <220>
 <223> Ligante H4 (PN)

 10 <400> 158
 ggtggcggtg gctcgggcgg tggtaggatct gggaattct 39

 <210> 159
 15 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 20 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 <223> Ligante H4 (AA)

 25 <400> 159

 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser
 1 5 10

 30
 <210> 160
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 35
 <220>
 <223> Iniciador sintético

 <220>
 40 <223> Ligante H5 (PN)

 <400> 160
 aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggga attct 45

 45
 <210> 161
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 50
 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 55 <223> Ligante H5 (AA)

 <400> 161

 Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser
 1 5 10 15
 60

<210> 162
 <211> 54
 <212> DNA
 5 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético

 10 <220>
 <223> Ligante H6 (PN)

 <400> 162
 ggtggcgggtg gctcgggcgg tggatgatct gggggaggag gcagcgggaa ttct 54
 15

 <210> 163
 <211> 18
 <212> PRT
 20 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 25 <220>
 <223> Ligante H6 (AA)

 <400> 163
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

 Asn Ser
 35

 <210> 164
 <211> 24
 40 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético
 45
 <220>
 <223> Ligante H7 (PN)

 <400> 164
 50 ggggtgtccac cttgtccgaa ttct 24

 <210> 165
 <211> 8
 55 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 60
 <220>

<223> Ligante H7 (AA)
 <400> 165
 5 Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser
 1 5
 <210> 166
 10 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 15 <223> Iniciador sintético
 <220>
 <223> Ligante(G4S)3
 20 <400> 166
 ggtggcgggtg gatccggcgg aggtgggtcg ggtggcggcg gatct 45
 <210> 167
 25 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 <223> Ligante(G4S)3
 35 <400> 167
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 40 <210> 168
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 45 <220>
 <223> Iniciador sintético
 <220>
 50 <223> Ligante(G4S)4
 <400> 168
 ggtggcgggtg gctcgggcgg tggtggatct ggaggaggtg ggagcggggg aggtggcagt 60
 55 <210> 169
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 60 <220>

<223> Peptídeo sintético
 <220>
 <223> Ligante (G4S)₄
 5
 <400> 169
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 10
 Ser
 <210> 170
 15 <211> 2337
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 20 <223> Polinucleotídeo sintético
 <220>
 <223> 2H7sssIgG1-STD1-2e12HL (DNA)
 25 <400> 170
 aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tctgctaata cagtgcattca 60
 gtcataatgt ccagaggaca aattgtttct tcccagttct cagcaatcct gtctgcattct 120
 30 ccaggggaga aggtcacaaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
 taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccttggattt atgccccatc caacctgggt 240
 tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctgga cctcttactc tctcacaatc 300
 35 agcagagtgg aggtgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
 cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcgggtgt 420
 40 ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcgggtg 480
 aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
 aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
 45 ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
 gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctccagcagc tgacatctga agactctgag 720
 50 gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
 ggcacagggg ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
 acatccccac cgagctcagc acctgaactc ctggggggac cgtcagttct cctcttcccc 900
 55 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtgtg 960
 gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
 60 cataatgccg agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc 1080

gtctctaccg tcttgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
 5 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
 10 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggtctcttc 1380
 ttctcttaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
 15 ccgggtaaga attatgggtg cgggtggctg ggcgggtggg gatctggagg aggtgggagt 1560
 gggaattctc aggtgcagct gaaggagtca ggacctggcc tgggtggcgc ctccacagagc 1620
 ctgtccatca catgcaccgt ctccgggttc tcattaaccg gctatgggtg aaactgggtt 1680
 20 cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg ctgggaatga tatggggtga tggaagcaca 1740
 gactataatt cagctctcaa atccagacta tcgatcacca aggacaactc caagagccaa 1800
 25 gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccagatacta ctgtgctcga 1860
 gatggttata gtaactttca ttactatggt atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 1920
 accgtctcct ctgggggtgg aggtctctgt ggcgggtggg ccggcgaggg tgggtcgggt 1980
 30 ggcggcggat ctgacattgt gctcacccaa tctccagctt ctttggctgt gtctctaggt 2040
 cagagagcca ccatctcctg cagagccagt gaaagtgttg aatattatgt cacaagttta 2100
 35 atgcagtggg accaacagaa accaggacag ccacccaaac tctcatctc tgctgctagc 2160
 aacgtagaat ctgggggtccc tgccagggtt agtggcagtg ggtctgggac agacttttagc 2220
 ctcaacatcc atctctgtga ggaggatgat attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg 2280
 40 aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaacgtta atctaga 2337

45 <210> 171
 <211> 772
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 50 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético
 <220>
 <223> 2H7sssIgG1-STD1-2e12HL (AA)
 55 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(22)
 <223> Líder
 60 <220>
 <221> misc_característica

```

    <222> (23)..(128)
    <223> VL

    <220>
5   <221> misc_característica
    <222> (129)..(144)
    <223> Ligante

    <220>
10  <221> misc_característica
    <222> (145)..(265)
    <223> VH

    <220>
15  <221> misc_característica
    <222> (268)..(281)
    <223> Dobradiça

    <220>
20  <221> misc_característica
    <222> (500)..(519)
    <223> Ligante de EFD-BD2

    <220>
25  <221> misc_característica
    <222> (520)..(640)
    <223> VH2

    <220>
30  <221> misc_característica
    <222> (641)..(660)
    <223> Ligante2

    <220>
35  <221> misc_característica
    <222> (661)..(772)
    <223> VL2

    <400> 171
40
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10          15

45 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
      20          25          30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
50      35          40          45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
      50          55          60

55 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
      65          70          75          80

60 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

```

	85	90	95
5	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp 100 105 110		
10	Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys 115 120 125		
15	Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser 130 135 140		
20	Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala 145 150 155 160		
25	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr 165 170 175		
30	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile 180 185 190		
35	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe 195 200 205		
40	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 210 215 220		
45	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys 225 230 235 240		
50	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp 245 250 255		
55	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser 260 265 270		
60	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly 275 280 285		
	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 290 295 300		
	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 305 310 315 320		
	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 325 330 335		

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350
 5 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365
 10 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380
 15 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415
 20 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430
 25 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445
 30 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460
 35 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 40 Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510
 45 Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro
 515 520 525
 50 Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
 530 535 540
 Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro
 545 550 555 560
 55 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
 565 570 575
 60 Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn

	580	585	590
5	Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp 595 600 605		
10	Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr 610 615 620		
15	Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser 625 630 635 640		
20	Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala 660 665 670		
25	Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser 675 680 685		
30	Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 690 695 700		
35	Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser 705 710 715 720		
40	Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser 725 730 735		
45	Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys 740 745 750		
50	Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 755 760 765		
55	Glu Ile Lys Arg 770		
60	<210> 172 <211> 772 <212> PRT <213> Sequência artificial		
	<220> <223> Polipeptídeo sintético		
	<220> <223> 2H7sssIgG1(P238S/P331S)-STD1-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)		

```

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(22)
    <223> Líder
5
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (23)..(128)
    <223> VL
10
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (129)..(144)
    <223> Ligante
15
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (145)..(265)
    <223> VH
20
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (268)..(282)
    <223> Dobradiça
25
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (500)..(519)
    <223> Ligante de EFD-BD2
30
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (520)..(640)
    <223> VH2
35
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (641)..(660)
    <223> Ligante2
40
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (661)..(772)
    <223> VL2
45
    <400> 172

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10          15

50
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
          20          25          30

55
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
          35          40          45

60
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
          50          55          60

```


	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
	305	310 315 320
5	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
		325 330 335
10	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
		340 345 350
15	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
		355 360 365
20	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile	
		370 375 380
25	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
		385 390 395 400
30	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	
		405 410 415
35	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	
		420 425 430
40	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	
		435 440 445
45	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	
		450 455 460
50	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	
		465 470 475 480
55	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	
		485 490 495
60	Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
		500 505 510
65	Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro	
		515 520 525
70	Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser	
		530 535 540
75	Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro	
		545 550 555 560

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
 565 570 575
 5
 Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn
 580 585 590
 10
 Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
 595 600 605
 15
 Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr
 610 615 620
 20
 Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 625 630 635 640
 25
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 645 650 655
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 660 665 670
 30
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 675 680 685
 35
 Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 690 695 700
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
 705 710 715 720
 40
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
 725 730 735
 45
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
 740 745 750
 50
 Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 755 760 765
 55
 Glu Ile Lys Arg
 770
 60
 <210> 173
 <211> 2322
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

<220>
 <223> 2H7sssIgG1-STD1-2e12LH (DNA)

<400> 173
 10 aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaata cagtgcattca 60
 gtcataaatgt ccagaggaca aattgtttctc tcccagttctc cagcaatcct gtctgcatct 120
 ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
 15 taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccttggtattt atgccccatc caacctgggt 240
 tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc 300
 agcagagtgg aggtgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
 20 cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcgggtgg 420
 ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtgggtg 480
 25 aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
 aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
 ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
 30 gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagagcc tgacatctga agactctgcg 720
 gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
 35 ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
 acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggg 960
 40 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt 1020
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
 45 gtctctaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1140
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
 50 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
 55 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
 ccgggtaaga attatgggtg cgggtggctc ggcgggtggg gatctggagg aggtgggagt 1560
 60 gggaattctg acattgtgct caccatctt ccagcttctt tggctgtgtc tctaggtcag 1620

```

agagccacca tctcctgcag agccagtgaag agtgttgaat attatgtcac aagtttaatg 1680
cagtgggtacc aacagaaacc aggacagcca cccaaactcc tcattctctgc tgctagcaac 1740
5 gtagaatctg gggtcctctgc caggttttagt ggcagtgggt ctgggacaga ctttagcctc 1800
aacatccatc ctgtggagga ggatgatatt gcaatgtatt tctgtcagca aagtaggaag 1860
10 gttccatgga cgttcggtgg aggcaccaag ctggaaatca aacgggggtgg cggtaggatcc 1920
ggcggagggtg ggtcgggtgg cggcggatct caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc 1980
ctgggtggcgc cctcacagag cctgtccatc acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc 2040
15 ggctatgggtg taaactgggt tcgccagcct ccaggaaaagg gtctggagtg gctgggaatg 2100
atatgggggtg atggaagcac agactataat tcagctctca aatccagact atcgatcacc 2160
20 aaggacaact ccaagagcca agttttctta aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca 2220
gccagatact actgtgctcg agatgggttat agtaactttc attactatgt tatggactac 2280
tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcttaatcta ga 2322
25
<210> 174
<211> 767
<212> PRT
30 <213> Sequência artificial
<220>
<223> Polipeptídeo sintético
35 <220>
<223> 2H7sssIgG1-STD1-2e12LH (w/2e12 Líder) (AA)
<220>
<221> misc_característica
40 <222> (1)..(22)
<223> Líder
<220>
<221> misc_característica
45 <222> (23)..(128)
<223> VL
<220>
<221> misc_característica
50 <222> (129)..(144)
<223> Ligante
<220>
<221> misc_característica
55 <222> (145)..(265)
<223> VH
<220>
<221> misc_característica
60 <222> (268)..(282)
<223> Dobradiça

```

```

<220>
<221> misc_característica
<222> (500)..(519)
5 <223> Ligante de EFD-BD2

<220>
<221> misc_característica
<222> (520)..(631)
10 <223> VL2

<220>
<221> misc_característica
<222> (632)..(646)
15 <223> Ligante2

<220>
<221> misc_característica
<222> (647)..(767)
20 <223> VH2

<400> 174

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
25 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
30 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
40 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
45 85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
50 100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
55 130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
60 145 150 155 160

```

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 165 170 175
 5

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 180 185 190

10 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 195 200 205

15 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220

20 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 225 230 235 240

25 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
 260 265 270

30 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 275 280 285

35 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300

40 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335

45 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350

50 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365

55 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380

60 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415
 5
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430
 10 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445
 15 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460
 20 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 25 Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510
 30 Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 515 520 525
 35 Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
 530 535 540
 Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
 545 550 555 560
 40 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn
 565 570 575
 45 Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 580 585 590
 50 Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
 595 600 605
 55 Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
 610 615 620
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 625 630 635 640
 60 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly

	645	650	655
5	Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly		
	660	665	670
10	Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly		
	675	680	685
15	Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp		
	690	695	700
20	Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser		
	705	710	715
25	Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr		
	725	730	735
30	Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr		
	740	745	750
35	Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
	755	760	765
40	<210> 175		
	<211> 767		
	<212> PRT		
	<213> Sequência artificial		
45	<220>		
	<223> Polipeptídeo sintético		
50	<220>		
	<221> misc_característica		
	<222> (1)..(22)		
	<223> Líder		
55	<220>		
	<221> misc_característica		
	<222> (23)..(128)		
	<223> VL		
60	<220>		
	<221> misc_característica		
	<222> (129)..(144)		
	<223> Ligante		
65	<220>		
	<221> misc_característica		
	<222> (145)..(265)		
	<223> VH		

```

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (268)..(282)
    <223> Dobradiça
5
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (500)..(519)
    <223> Ligante de EFD-BD2
10
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (520)..(631)
    <223> VL2
15
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (632)..(646)
    <223> Ligante2
20
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (647)..(767)
    <223> VH2
25
    <400> 175

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10          15

30
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
          20          25          30

35
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
          35          40          45

40
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
          50          55          60

45
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65          70          75          80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
          85          90          95

50
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
          100          105          110

55
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          115          120          125

60
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
          130          135          140

```


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

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400
 5 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415
 10 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430
 15 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460
 20 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 25 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 30 Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510
 Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 515 520 525
 35 Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
 530 535 540
 40 Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
 545 550 555 560
 45 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn
 565 570 575
 50 Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 580 585 590
 Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
 595 600 605
 55 Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
 610 615 620
 60 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 625 630 635 640

5 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly
 645 650 655
 Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly
 660 665 670
 10 Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly
 675 680 685
 15 Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp
 690 695 700
 20 Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser
 705 710 715 720
 Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
 725 730 735
 25 Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr
 740 745 750
 30 Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 755 760 765
 35 <210> 176
 <211> 2376
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 40 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 <220>
 <223> 2H7sssIgG1-STD2-2e12LH (DNA)
 45 <400> 176
 aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaata cagtgcattca 60
 gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tccagtcctc cagcaatcct gtctgcatct 120
 50 ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
 taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccttgattt atgcccatac caacctggct 240
 tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc 300
 55 agcagagtgg aggtgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
 cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggg 420
 60 ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcgggtg 480

	aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac	540
	aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat	600
5	ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta	660
	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagcagc tgacatctga agactctgcg	720
10	gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg	780
	ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac	840
	acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc	900
15	ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg	960
	gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggg acgtggacgg cgtggaggtg	1020
20	cataatgcc aagacaaagcc gcgaggagg cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	1080
	gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	1140
	aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga	1200
25	gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc	1260
	ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	1320
30	gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	1380
	ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1440
	tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct	1500
35	ccgggtaaga attatggtgg cgggtggctc ggcgggtggg gatctggagg aggtgggagt	1560
	gggaattatg gtggcgggtg ctccggcggg ggtggatctg gaggaggtgg gagtgggaat	1620
40	tctgacattg tctcaccaca atctccagct tctttggctg tgtctctagg tcagagagcc	1680
	accatctcct gcagagccag tgaaagtgtt gaattattatg tcacaagttt aatgcagtgg	1740
	taccaacaga aaccaggaca gccacccaaa ctctcatct ctgctgctag caacgtagaa	1800
45	tctggggtcc ctgccaggtt tagtggcagt gggctctggga cagactttag cctcaacatc	1860
	catcctgtgg agggagatga tattgcaatg tatttctgtc agcaaagtag gaaggttcca	1920
50	tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg gtggcgggtg atccggcgga	1980
	ggtgggtcgg gtggcggcgg atctcaggtg cagctgaagg agtcaggacc tggcctggtg	2040
	gcgccctcac agagcctgtc catcacatgc accgtctcag ggttctcatt aaccggctat	2100
55	ggtgtaaact gggttcgcca gcctccagga aagggctctg agtggctggg aatgatatgg	2160
	ggtgatggaa gcacagacta taattcagct ctcaaatcca gactatcgat caccaaggac	2220
60	aactccaaga gccaaagttt cttaaaaatg aacagtctgc aaactgatga cacagccaga	2280
	tactactgtg ctcgagatgg ttatagtaac ttctattact atgttatgga ctactggggt	2340

caaggaacct cagtcaccgt ctctctttaa tctaga

2376

5 <210> 177
 <211> 785
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

10 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético

 <220>
 <223> 2H7sssIgG1-STD2-2e12LH (w/2e12 Líder)

15 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(22)
 <223> Líder

20 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (23)..(129)
 <223> VL

25 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (130)..(144)
 <223> Ligante

30 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (145)..(265)
 <223> VH

35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (268)..(282)
 <223> Dobradiça

40 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (500)..(537)
 <223> Ligante de EFD-BD2

45 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (538)..(649)
 <223> VL2

50 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (650)..(664)
 <223> Ligante2

55 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (665)..(785)
 <223> VH2

60 <400> 177

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

	245	250	255
5	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser 260 265 270		
10	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly 275 280 285		
15	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 290 295 300		
20	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 305 310 315 320		
25	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 325 330 335		
30	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr 340 345 350		
35	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly 355 360 365		
40	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 370 375 380		
45	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 385 390 395 400		
50	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser 405 410 415		
55	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu 420 425 430		
60	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro 435 440 445		
65	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val 450 455 460		
70	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met 465 470 475 480		
75	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser 485 490 495		

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510
 5
 Gly Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 515 520 525
 10 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
 530 535 540
 Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 545 550 555 560
 15 Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp
 565 570 575
 20 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala
 580 585 590
 25 Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 595 600 605
 30 Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile
 610 615 620
 Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly
 625 630 635 640
 35 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 645 650 655
 40 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly
 660 665 670
 45 Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val
 675 680 685
 50 Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro
 690 695 700
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser
 705 710 715 720
 55 Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp
 725 730 735
 60 Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp

	740	745	750

5 Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His
 755 760 765

10 Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 770 775 780

15 Ser
 785

15 <210> 178
 <211> 785
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

20 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético

25 <220>
 <223> 2H7sssIgG1 (P238S/P331S)-STD2-2e12LH (w/2e12 Líder) (AA)

30 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(22)
 <223> Líder

35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (23)..(128)
 <223> VL

40 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (129)..(144)
 <223> Ligante

45 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (145)..(265)
 <223> VH

50 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (268)..(281)
 <223> Dobradiça

55 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (500)..(537)
 <223> Ligante de EFD-BD2

60 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (538)..(649)
 <223> VL2

60 <220>

```

<221> misc_característica
<222> (650)..(664)
<223> Ligante2

5  <220>
    <221> misc_característica
    <222> (665)..(785)
    <223> VH2

10 <400> 178

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1      5      10      15

15 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
      20      25      30

20 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
      35      40      45

25 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
      50      55      60

30 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65      70      75      80

35 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
      85      90      95

40 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
      100      105      110

45 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
      115      120      125

50 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130      135      140

55 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145      150      155      160

60 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      165      170      175

65 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      180      185      190

60 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
      195      200      205

```

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220
 5
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 225 230 235 240
 10 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255
 15 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
 260 265 270
 20 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 275 280 285
 Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300
 25 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 305 310 315 320
 30 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335
 35 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350
 40 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
 370 375 380
 45 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400
 50 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415
 55 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430
 60 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460
 5 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 10 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510
 15 Gly Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 515 520 525
 20 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
 530 535 540
 25 Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 545 550 555 560
 30 Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp
 565 570 575
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala
 580 585 590
 35 Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 595 600 605
 40 Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile
 610 615 620
 45 Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly
 625 630 635 640
 50 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 645 650 655
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly
 660 665 670
 55 Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val
 675 680 685
 60 Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro
 690 695 700

5 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser
 705 710 715 720
 Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp
 725 730 735
 10 Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp
 740 745 750
 15 Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His
 755 760 765
 20 Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 770 775 780
 Ser
 785
 25 <210> 179
 <211> 2391
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 30 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 <220>
 35 <223> 2H7sssIgG1-STD2-2e12HL (DNA)
 <400> 179
 aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcttgctaata cagtgcattca 60
 40 gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tccagctctc cagcaatcct gtctgcatct 120
 ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
 taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240
 45 tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc 300
 agcagagtgg aggetgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
 50 cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcgggtgt 420
 ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtctgtg 480
 aggcttggg cctcagtga gatgtctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
 55 aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
 ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
 60 gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagcagc tgacatctga agactctgcg 720

```

      gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtcttg 780
      ggcacagggg ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
5     acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
      ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960
10    gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 1020
      cataatgcc aagacaaagg gggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
      gtcttcaccg tcttcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
15    aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
      gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
      ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg cgtggagtg ggagagcaat 1320
20    gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
      ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
25    tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
      ccgggtaaga attatggtgg cgggtggctc ggccgtgggt gatctggagg aggtgggagt 1560
      gggattatg gtggcgggtg ctccggcggt ggtggatctg gaggagggtg gagtgggaat 1620
30    tctcaggtgc agctgaagga gtcaggacct ggccgtgggt cgcctcaca gagcctgtcc 1680
      atcacatgca ccgtctcagg gttctcatta accggctatg gtgtaaactg ggttcgccag 1740
35    cctccaggaa agggctctgga gtggctggga atgatatggg gtgatggaag cacagactat 1800
      aattcagctc tcaaaccag actatcgatc accaaggaca actccaagag ccaagttttc 1860
      ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac acagccagat actactgtgc tcgagatggt 1920
40    tatagtaact ttcattacta tgttatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 1980
      tctcttgggg gtggaggctc tgggtggcgg gtatccggcg gaggtgggtc ggggtggcggc 2040
45    ggatctgaca ttgtgtcac ccaatctcca gcttctttgg ctgtgtctct aggtcagaga 2100
      gccaccatct cctgcagagc cagtgaaggt gttgaatatt atgtcacaag tttaatgcag 2160
      tggtagcaac agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctctgctgc tagcaacgta 2220
50    gaatctgggg tccctgccag gtttagtggc agtgggtctg ggacagactt tagcctcaac 2280
      atccatcctg tggaggagga tgatattgca atgtatttct gtcagcaaag taggaaggtt 2340
55    ccatggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gttaatctag a 2391

```

<210> 180

<211> 790

60 <212> PRT

<213> Sequência artificial

```

<220>
<223> Polipeptídeo sintético

5  <220>
    <223> 2H7sssIgG1-STD2-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

    <220>
    <221> misc_característica
10  <222> (1)..(22)
    <223> Líder

    <220>
    <221> misc_característica
15  <222> (23)..(128)
    <223> VL

    <220>
    <221> misc_característica
20  <222> (129)..(144)
    <223> Ligante

    <220>
    <221> misc_característica
25  <222> (145)..(265)
    <223> VH

    <220>
    <221> misc_característica
30  <222> (268)..(282)
    <223> Dobradiça

    <220>
    <221> misc_característica
35  <222> (500)..(537)
    <223> Ligante de EFD-BD2

    <220>
    <221> misc_característica
40  <222> (538)..(658)
    <223> VH2

    <220>
    <221> misc_característica
45  <222> (659)..(678)
    <223> Ligante2

    <220>
    <221> misc_característica
50  <222> (679)..(790)
    <223> VL2

<400> 180
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
55  1          5          10          15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
        20          25          30
60

```

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

5 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

10 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

15 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110

20 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

25 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 130 135 140

30 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
 145 150 155 160

35 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 165 170 175

40 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 195 200 205

45 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220

50 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 225 230 235 240

55 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
 260 265 270

60 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300
 5
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 305 310 315 320
 10
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335
 15 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350
 20 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365
 25 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400
 30 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415
 35 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430
 40 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445
 45 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 50 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 55 Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510
 Gly Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 515 520 525
 60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser
 530 535 540

5 Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr
 545 550 555 560

10 Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln
 565 570 575

15 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly
 580 585 590

Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys
 595 600 605

20 Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
 610 615 620

25 Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe
 625 630 635 640

30 His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 645 650 655

35 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 660 665 670

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
 675 680 685

40 Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 690 695 700

45 Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln
 705 710 715 720

50 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val
 725 730 735

55 Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 740 745 750

Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr
 755 760 765

60 Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 770 775 780

Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 785 790
 5
 <210> 181
 <211> 790
 <212> PRT
 10 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético
 15 <220>
 <223> 2H7sssIgG1(P238S/P331S)-STD2-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)
 <220>
 <221> misc_característica
 20 <222> (1)..(22)
 <223> Líder
 <220>
 <221> misc_característica
 25 <222> (23)..(128)
 <223> VL
 <220>
 <221> misc_característica
 30 <222> (129)..(144)
 <223> Ligante
 <220>
 <221> misc_característica
 35 <222> (145)..(265)
 <223> VH
 <220>
 <221> misc_característica
 40 <222> (268)..(282)
 <223> Dobradiça
 <220>
 <221> misc_característica
 45 <222> (500)..(537)
 <223> Ligante de EFD-BD2
 <220>
 <221> misc_característica
 50 <222> (538)..(658)
 <223> VH2
 <220>
 <221> misc_característica
 55 <222> (659)..(678)
 <223> Ligante2
 <220>
 <221> misc_característica
 60 <222> (679)..(790)
 <223> VL2

<400> 181

5 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

10 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

15 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

20 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

25 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

30 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

35 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

40 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

45 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

50 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

55 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

60 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

5 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

10 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

15 Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

20 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

25 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

30 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

35 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
370 375 380

40 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

45 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

50 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

55 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

60 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

	485	490	495
5	Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 500 505 510		
10	Gly Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 515 520 525		
15	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser 530 535 540		
20	Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr 545 550 555 560		
25	Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln 565 570 575		
30	Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly 580 585 590		
35	Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys 595 600 605		
40	Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr 610 615 620		
45	Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe 625 630 635 640		
50	His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val 645 650 655		
55	Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 660 665 670		
60	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser 675 680 685		
	Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser 690 695 700		
	Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln 705 710 715 720		
	Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val 725 730 735		

Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 740 745 750

5 Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr
 755 760 765

10 Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 770 775 780

15 Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 785 790

20 <210> 182
 <211> 2283
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

25 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

30 <400> 182
 aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcttgctaata cagtgtctca 60
 gtcataaatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
 ccaggggaga aggtcacaaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
 35 taccagcaga agccaggatc ctccccaaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240
 tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc 300
 40 agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
 cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcgggtgt 420
 ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcgggtg 480
 45 aggcttggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
 aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
 50 ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
 gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacgcagcc tgacatctga agactctgcg 720
 gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
 55 ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
 acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
 60 ccaaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 1020
 cataatgccca agacaaagcc gcgaggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc 1080
 5 gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
 aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
 10 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccagggtcagc 1260
 ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg tggactccga cggctccttc 1380
 15 ttctcttaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
 ccgggtaaga attctcaggc gcagctgaag gagtcaggac ctggcctggt ggcgccctca 1560
 20 cagagcctgt ccatcacatg caccgtctca gggttctcat taaccggcta tgggtgaaac 1620
 tgggttcgcc agcctccagg aaagggctctg gagtggctgg gaatgatatg gggtgatgga 1680
 25 agcacagact ataattcagc tctcaaatcc agactatcga tcaccaagga caactccaag 1740
 agccaagttt tcttaaaaat gaacagtctg caaactgatg acacagccag atactactgt 1800
 gctcgagatg gttatagtaa ctttcattac tatgttatgg actactgggg tcaaggaacc 1860
 30 tcagtcaccg tctcctctgg ggggtggaggc tctgggtggc gtggatccgg cggagggtggg 1920
 tcgggtggcg gcggatctga cattgtgctc acccaatctc cagcttcttt ggctgtgtct 1980
 35 ctaggtcaga gagccaccat ctctgcaga gccagtgaag gtgttgaaata ttatgtcaca 2040
 agtttaatgc agtggtagca acagaaacca ggacagccac ccaaactcct catctctgct 2100
 gctagcaacg tagaatctgg ggtccctgcc aggttttagtg gcagtgggtc tgggacagac 2160
 40 tttagcctca acatccatcc tgtggaggag gatgatattg caatgtattt ctgtcagcaa 2220
 agtaggaagg ttccatggac gttcgggtgga ggcaccaagc tggaaatcaa acgttaatct 2280
 45 aga 2283

<210> 183
 <211> 754
 50 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético
 55 <220>
 <223> 2H7sssIgG1-H1-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

 <220>
 60 <221> misc_característica
 <222> (1)..(22)


```

    <223> Líder
    <220>
    <221> misc_característica
    5  <222> (23)..(128)
    <223> VL

    <220>
    <221> misc_característica
    10 <222> (129)..(144)
    <223> Ligante

    <220>
    <221> misc_característica
    15 <222> (145)..(265)
    <223> VH

    <220>
    <221> misc_característica
    20 <222> (268)..(281)
    <223> Dobradiça

    <220>
    <221> misc_característica
    25 <222> (500)..(501)
    <223> Ligante de EFD-BD2

    <220>
    <221> misc_característica
    30 <222> (502)..(622)
    <223> VH2

    <220>
    <221> misc_característica
    35 <222> (623)..(642)
    <223> Ligante2

    <220>
    <221> misc_característica
    40 <222> (643)..(754)
    <223> VL2

    <400> 183

45 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
   1             5             10             15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
50             20             25             30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
55             35             40             45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
             50             55             60

60 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

```

	65		70		75		80
5	Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile	85		90		95	
10	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp	100		105		110	
15	Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	115		120		125	
20	Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser	130		135		140	
25	Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala	145		150		155	160
30	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	165		170		175	
35	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile	180		185		190	
40	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	195		200		205	
45	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	210		215		220	
50	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	225		230		235	240
55	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp	245		250		255	
60	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser	260		265		270	
	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	275		280		285	
	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	290		295		300	
	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	305		310		315	320

5 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335

 10 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350

 15 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365

 20 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380

 25 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400

 30 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415

 35 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430

 40 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445

 45 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460

 50 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480

 55 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495

 60 Pro Gly Lys Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 500 505 510

 65 Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
 515 520 525

 70 Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 530 535 540

 75 Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr
 545 550 555 560

[illegible]

<400> 184
 aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tectgctaata cagtgtctca 60
 5 gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtcct cagcaatcct gtctgcatct 120
 ccaggggaga aggtcacaat gacttgccag gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
 10 taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccttggtatt atgccccatc caacctggct 240
 tctggagtc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctgga cctcttactc tctcacaatc 300
 agcagagtgg aggtgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaacca 360
 15 cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggg 420
 ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480
 aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
 20 aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
 ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
 25 gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctccagcagc tgacatctga agactctgcg 720
 gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
 ggcacagga ccacggtcac cgtctctgat caggagcca aatcttctga caaaactcac 840
 30 acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc 900
 ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960
 35 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
 cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
 gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
 40 aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
 45 ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatc cgtggagtg ggagagcaat 1320
 gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgctc tggactcga cggctccttc 1380
 ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
 50 tgctccgtga tgcagaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
 ccgggtaagg gtggcggtg ctcggggaat tctcaggtgc agctgaagga gtcaggacct 1560
 ggcctggtg cgccctcaca gagcctgtcc atcacatgca ccgtctcagg gttctcatta 1620
 55 accggtatg gtgtaaaact ggctcgccag cctccaggaa agggctctgga gtggctggga 1680
 atgatatggg gtgatggaag cacagactat aattcagctc tcaaatccag actatcgatc 1740
 60 accaaggaca actccaagag ccaagtttct ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac 1800

```

acagccagat actactgtgc tcgagatggt tataagtaact ttcattacta tggttatggac 1860
tactgggggc aaggaacctc agtcaccgtc tcctctgggg gtggagggtc tggaggcggt 1920
5  ggatccggcg gaggtgggtc ggggtggcgc ggatctgaca ttgtgtcac ccaatctcca 1980
gcttcttttg ctgtgtctct aggtcagaga gccaccatct cctgcagagc cagtgaagt 2040
gttgaatatt atgtcacaag tttaatgcag tggtagcaac agaaaccagg acagccaccc 2100
10 aaactcctca tctctgtctc tagcaacgta gaatctgggg tcctgccag gtttagtggc 2160
agtgggtctg ggacagactt tagcctcaac atccatcctg tggaggagga tgatattgca 2220
15 atgtatttct gtcagcaaag taggaaggtt ccatggacgt tcggtggagg caccaagctg 2280
gaaatcaaac gttaatctag a 2301

20 <210> 185
   <211> 760
   <212> PRT
   <213> Sequência artificial

25 <220>
   <223> Polipeptídeo sintético

   <220>
   <223> 2H7sssIgG1-H2-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)
30 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (1)..(22)
   <223> Líder

35 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (23)..(127)
   <223> VL

40 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (128)..(144)
   <223> Ligante

45 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (145)..(265)
   <223> VH

50 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (268)..(282)
   <223> Dobradiça

55 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (500)..(507)
   <223> Ligante de EFD-BD2

60 <220>

```

```

<221> misc_característica
<222> (508)..(628)
<223> VH2

5  <220>
    <221> misc_característica
    <222> (629)..(648)
    <223> Ligante2

10 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (649)..(760)
    <223> VL2

15 <400> 185

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1      5      10      15

20 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
      20      25      30

25 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
      35      40      45

30 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
      50      55      60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65      70      75      80

35 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
      85      90      95

40 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
      100      105      110

45 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
      115      120      125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130      135      140

50 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145      150      155      160

55 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      165      170      175

60 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      180      185      190

```

5 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 195 200 205
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220
 10 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 225 230 235 240
 15 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255
 20 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
 260 265 270
 25 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 275 280 285
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300
 30 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 305 310 315 320
 35 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335
 40 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365
 45 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380
 50 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400
 55 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415
 60 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430

	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
				435					440				445				
5	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
		450					455					460					
10	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
	465					470					475				480		
15	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
					485					490					495		
20	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	
				500					505					510			
25	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	
		515						520					525				
30	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Gly	Tyr	Gly	Val	Asn	Trp	Val	
		530					535					540					
35	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Met	Ile	Trp	Gly	
	545					550					555					560	
40	Asp	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	
					565					570					575		
45	Thr	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	
				580					585					590			
50	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Tyr	Ser	
			595					600					605				
55	Asn	Phe	His	Tyr	Tyr	Val	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	
		610					615					620					
60	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
	625					630					635				640		
65	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	
					645				650						655		
70	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	
				660					665					670			
75	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Glu	Tyr	Tyr	Val	Thr	Ser	Leu	Met	Gln	Trp	Tyr	
		675						680					685				

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser
 690 695 700
 5

Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 705 710 715 720

10 Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala
 725 730 735

15 Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 740 745 750

20 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 755 760

25 <210> 186
 <211> 2307
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

30 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

35 <400> 186
 aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcttgetaat cagtgtctca 60
 gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
 ccagggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgactgg 180

40 taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccttggattt atgccccatc caacctggct 240
 tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt ggggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

45 agcagagtgg aggtgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccce 360
 cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggg 420
 ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtgggtg 480

50 aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
 aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

55 ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
 gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagagcc tgacatctga agactctgag 720
 gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actgggtactt cgatgtctgg 780

60 ggcacagggg ccacgggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

```

acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg 960
5 gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
10 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
15 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
ggcgagccgg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
20 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
ccgggtaaga attatggtgg cgggtggctct ggggaattctc aggtgcagct gaaggagtca 1560
25 ggacctggcc tgggtggcgc ctcacagagc ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc 1620
tcattaaccg gctatggtgt aaactgggtt cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg 1680
ctgggaatga tatggggtga tggaagcaca gactataatt cagctctcaa atccagacta 1740
30 tcgatcacca aggacaactc caagagccaa gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaaact 1800
gatgacacag ccagataacta ctgtgctcga gatgggtata gtaactttca ttactatggt 1860
35 atggactact ggggtcaaagg aacctcagtc accgtctcct ctgggggtgg aggtctctgt 1920
ggcgggtggat ccggcggagg tgggtcgggt ggcggcggat ctgacattgt gtcacccaa 1980
tctccagctt ctttggctgt gtctctaggt cagagagcca ccatctcttg cagagccagt 2040
40 gaaagtgttg aatattatgt cacaagttta atgcagtggg accaacagaa accaggacag 2100
ccacccaaac tctcatctc tgctgctagc aacgtagaat ctgggggtccc tgccaggttt 2160
agtggcagtg ggtctgggac agactttagc ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat 2220
45 attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc 2280
aagctggaaa tcaaacgtta atctaga 2307
50
<210> 187
<211> 762
<212> PRT
<213> Sequência artificial
55
<220>
<223> Polipeptídeo sintético
<220>
60 <223> 2H7sssIgG1-H3-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

```

```

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(22)
<223> Líder
5
<220>
<221> misc_característica
<222> (23)..(128)
<223> VL
10
<220>
<221> misc_característica
<222> (129)..(144)
<223> Ligante
15
<220>
<221> misc_característica
<222> (145)..(265)
<223> VH
20
<220>
<221> misc_característica
<222> (268)..(282)
<223> Dobradiça
25
<220>
<221> misc_característica
<222> (500)..(509)
<223> Ligante de EFD-BD2
30
<220>
<221> misc_característica
<222> (510)..(630)
<223> VH2
35
<220>
<221> misc_característica
<222> (631)..(650)
<223> Ligante2
40
<220>
<221> misc_característica
<222> (651)..(762)
<223> VL2
45
<400> 187

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10          15

50
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
          20          25          30

55
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
          35          40          45

60
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
          50          55          60

```

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

5

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

10

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110

15

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

20

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
 145 150 155 160

25

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 165 170 175

30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 180 185 190

35

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220

40

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 225 230 235 240

45

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255

50

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
 260 265 270

55

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300

60

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

	305		310		315		320
5	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	325		330		335	
10	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	340		345		350	
15	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	355		360		365	
20	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	370		375		380	
25	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	385		390		395	400
30	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	405		410		415	
35	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	420		425		430	
40	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	435		440		445	
45	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	450		455		460	
50	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	465		470		475	480
55	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	485		490		495	
60	Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln	500		505		510	
65	Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser	515		520		525	
70	Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn	530		535		540	
75	Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile	545		550		555	560

<223> 2H7sssIgG1-H4-2e12HL (DNA)

<400> 188

5	aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcttgctaata cagtgcattca	60
	gtcataatgt ccagaggaca aattgtttct tcccagttct cagcaatcct gtctgcatct	120
	ccagggggaga aggtcacaaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg	180
10	taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct	240
	tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc	300
15	agcagagtgg aggtctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca	360
	cccacgttcc gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggg	420
	ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg	480
20	aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac	540
	aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat	600
25	ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta	660
	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagagcc tgacatctga agactctgcg	720
	gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg	780
30	ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac	840
	acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc	900
	ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg	960
35	gacgtgagcc acgaagacc tgaggccaag ttcaactggg acgtggacgg cgtggagggtg	1020
	cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	1080
40	gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc	1140
	aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga	1200
	gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc	1260
45	ctgacctgcc tggccaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaat	1320
	gggcagccgg agaacaacta caagaccagc cctcccgctc tggactccga cggctccttc	1380
50	ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtgg agcaggggaa cgtcttctca	1440
	tgtccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcctgtct	1500
	ccgggtaagg gtggcggtgg ctcgggcggt ggtggatctg ggaattctca ggtgcagctg	1560
55	aaggagtcat gacctggcct ggtggcgccc tcacagagcc tgtccatcac atgcaaccgtc	1620
	tcagggttct cattaaccgg ctatggtgta aactgggttc gccagcctcc aggaaggggt	1680
60	ctggagtggc tgggaatgat atggggtgat ggaagcacag actataattc agctctcaaa	1740
	tccagactat cgatcaccaa ggacaactcc aagagccaag ttttcttaaa aatgaacagt	1800

ctgcaaactg atgacacagc cagatactac tgtgctcgag atgggttatag taactttcat 1860
 tactatgtta tggactactg ggggtcaagga acctcagtca cegtctcttc tgggggtgga 1920
 5 ggctctgggtg gcggtggatc cggcggaggt gggtcgggtg gcggcggatc tgacattgtg 1980
 ctcacccaat ctccagcttc tttggctgtg tctctaggtc agagagccac catctctgc 2040
 10 agagccagtg aaagtgttga atattatgtc acaagtttaa tgcagtggta ccaacagaaa 2100
 ccaggacagc cacccaaact cctcatctct gctgctagca acgtagaatc tggggtcct 2160
 gccaggttta gtggcagtgg gtctgggaca gacttttagcc tcaacatcca tcctgtggag 2220
 15 gaggatgata ttgcaatgta tttctgtcag caaagtagga aggttccatg gacgttcggt 2280
 ggaggcacca agctggaaat caaacgttaa tctaga 2316
 20
 <210> 189
 <211> 765
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 25
 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético
 <220>
 30 <223> 2H7sssIgG1-H4-2e12HL (AA)
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(22)
 35 <223> Líder
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (23)..(128)
 40 <223> VL
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (129)..(144)
 45 <223> Ligante
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (145)..(265)
 50 <223> VH
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (268)..(282)
 55 <223> Dobradiça
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (500)..(512)
 60 <223> Ligante de EFD-BD2

```

<220>
<221> misc_característica
<222> (513)..(633)
<223> VH2
5
<220>
<221> misc_característica
<222> (634)..(653)
<223> Ligante2
10
<220>
<221> misc_característica
<222> (654)..(765)
<223> VL2
15
<400> 189
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10          15

20
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
          20          25          30

25
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
          35          40          45

30
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
          50          55          60

35
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65          70          75          80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
          85          90          95

40
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
          100          105          110

45
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          115          120          125

50
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130          135          140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145          150          155          160

55
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          165          170          175

60
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile

```

	180	185	190
5	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe 195 200 205		
10	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 210 215 220		
15	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys 225 230 235 240		
20	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp 245 250 255		
25	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser 260 265 270		
30	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 275 280 285		
35	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 290 295 300		
40	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 305 310 315 320		
45	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 325 330 335		
50	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr 340 345 350		
55	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly 355 360 365		
60	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 370 375 380		
65	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 385 390 395 400		
70	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser 405 410 415		
75	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu 420 425 430		

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445
 5
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460
 10 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 15 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser
 500 505 510
 20 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 515 520 525
 25 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
 530 535 540
 30 Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 545 550 555 560
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 565 570 575
 35 Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 580 585 590
 40 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 595 600 605
 45 Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly
 610 615 620
 50 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 625 630 635 640
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 645 650 655
 55 Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala
 660 665 670
 60 Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser

	675	680	685	
5	Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu			
	690	695	700	
10	Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser			
	705	710	715	720
15	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu			
		725	730	735
20	Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro			
		740	745	750
25	Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
		755	760	765
	<210> 190			
	<211> 2322			
	<212> DNA			
	<213> Sequência artificial			
30	<220>			
	<223> Polinucleotídeo sintético			
	<220>			
	<223> 2H7sssIgG1-H5-2e12HL (DNA)			
35	<400> 190			
	aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaata cagtgcctca			60
	gtcataatgt ccagaggaca aattgtttct tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct			120
40	ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg			180
	taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct			240
	tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt ggggtctggga cctcttactc tctcacaatc			300
45	agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca			360
	cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggg			420
	ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg			480
50	aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac			540
	aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat			600
55	ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta			660
	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagagcc tgacatctga agactctgcg			720
	gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg			780
60	ggcacagggg ccacgggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac			840

	acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtcctt cctcttcccc	900
5	ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg	960
	gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg	1020
	cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	1080
10	gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	1140
	aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga	1200
15	gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc	1260
	ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	1320
	gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	1380
20	ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1440
	tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct	1500
25	cgggtaaga attatgggtg cgggtggctcg ggcgggtggtg gatctgggaa ttctcaggtg	1560
	cagctgaagg agtcaggacc tggcctgggtg gcgcctcac agagcctgtc catcacatgc	1620
	accgtctcag ggttctcatt aaccggctat ggtgtaaact gggttcgcca gcctccagga	1680
30	aagggtctgg agtggctggg aatgatatgg ggtgatggaa gcacagacta taattcagct	1740
	ctcaaatcca gactatcgat caccaaggac aactccaaga gccaaagtttt cttaaaaatg	1800
	aacagtctgc aaactgatga cacagccaga tactactgtg ctcgagatgg ttatagtaac	1860
35	tttcattact atgttatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctctggtg	1920
	ggtggaggct ctggtggcgg tggatccggc ggaggtgggt cgggtggcgg cggatctgac	1980
40	attgtgtctc cccaatctcc agcttctttg gctgtgtctc taggtcagag agccaccatc	2040
	tcctgcagag ccagtgaag tgttgaatat tatgtcacia gtttaatgca gtggtaccaa	2100
	cagaaaccag gacagccacc caaactctc atctctgctg ctagcaacgt agaactctggg	2160
45	gtccctgcca ggttttagtg cagtgggtct gggacagact ttagcctcaa catccatcct	2220
	gtggaggagg atgatattgc aatgtatttc tgtcagcaaa gtaggaagg tccatggacg	2280
50	ttcggtgagg gcaccaagct ggaaatcaaa cgttaattcta ga	2322
	<210> 191	
	<211> 767	
	<212> PRT	
55	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> Polipeptídeo sintético	
60	<220>	
	<223> 2H7sssIgG1-H5-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)	

```

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(22)
5    <223> Líder

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (23)..(128)
10   <223> VL

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (129)..(144)
15   <223> Ligante

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (145)..(265)
20   <223> VH

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (268)..(282)
25   <223> Dobradiça

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (500)..(514)
30   <223> Ligante de EFD-BD2

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (515)..(635)
35   <223> VH2

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (636)..(655)
40   <223> Ligante2

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (656)..(767)
45   <223> VL2

    <400> 191

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
50 1          5          10          15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
55          20          25          30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35          40          45

60
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

```

	50		55		60
5	Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro	65	70	75	80
10	Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile	85	90	95	
15	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp	100	105	110	
20	Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	115	120	125	
25	Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser	130	135	140	
30	Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala	145	150	155	160
35	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	165	170	175	
40	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile	180	185	190	
45	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	195	200	205	
50	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	210	215	220	
55	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	225	230	235	240
60	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp	245	250	255	
	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser	260	265	270	
	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	275	280	285	
	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	290	295	300	

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 305 310 315 320

5

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335

10

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365

15

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380

20

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400

25

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415

30

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430

35

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445

40

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480

45

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495

50

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510

55

Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro
 515 520 525

Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 530 535 540

60

Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

•

2.

<220>
 <223> 2H7sssIgG1-H6-2e12HL (DNA)

5 <400> 192
 aagccttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaata cagtgcattca 60
 gtcataatgt ccagaggaca aattgtttctc tcccagtcctc cagcaatcct gtctgcatct 120

10 ccaggggaga aggtcacaaat gacttgccagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
 taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

15 tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc 300
 agcagagtgg aggtgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

20 cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
 ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

25 aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
 aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccagggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
 gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagcagc tgacatctga agactctgcg 720

30 gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
 ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

35 acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 1020

40 cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
 gtctctaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc 1140

45 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

50 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

55 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
 ccgggtaagg gtggcggtgg ctggggcggt ggtggatctg ggggaggagg cagcggaat 1560

tctcaggtgc agctgaagga gtcaggacct ggctgggtg cgccctcaca gagcctgtcc 1620

60 atcacatgca ccgtctcagg gttctcatta accggctatg gtgtaaactg ggttcgccag 1680

```

cctccaggaa agggctctgga gtggctggga atgatatggg gtgatggaag cacagactat 1740
aattcagctc tcaaattccag actatcgatc accaaggaca actccaagag ccaagttttc 1800
5 ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac acagccagat actactgtgc tcgagatggt 1860
tataagtaact ttcattacta tggttatggac tactgggggc aaggaacctc agtcaccgtc 1920
10 tcctctgggg gtggaggctc tgggtggcgt ggatccggcg gaggtgggtc ggggtggcggc 1980
ggatctgaca ttgtgctcac ccaatctcca gcttctttgg ctgtgtctct aggtcagaga 2040
gccaccatct cctgcagagc cagtgaaggt gttgaatatt atgtcacaag tttaatgcag 2100
15 tggtagcaac agaaaccagg acagccaccc aaactctca tctctgctgc tagcaacgta 2160
gaatctgggg tcctgccag gtttagtggc agtgggtctg ggacagactt tagcctcaac 2220
atccatcctg tggaggagga tgatattgca atgtatttct gtcagcaaag taggaagggt 2280
20 ccatggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gttaatctag a 2331

```

```

25 <210> 193
    <211> 770
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial

```

```

30 <220>
    <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
    <223> 2H7sssIgG1-H6-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

```

```

35 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(22)
    <223> Líder

```

```

40 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (23)..(128)
    <223> VL

```

```

45 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (129)..(144)
    <223> Ligante

```

```

50 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (145)..(265)
    <223> VH

```

```

55 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (268)..(282)
    <223> Dobradiça

```

```

60 <220>
    <221> misc_característica

```

```

<222> (500)..(517)
<223> Ligante de EFD-BD2

<220>
5 <221> misc_característica
  <222> (518)..(638)
  <223> VH2

<220>
10 <221> misc_característica
   <222> (639)..(658)
   <223> Ligante2

<220>
15 <221> misc_característica
   <222> (659)..(770)
   <223> VL2

<400> 193
20 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
   1          5          10          15

25 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
   20          25          30

30 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
   35          40          45

35 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
   50          55          60

40 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
   65          70          75          80

40 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
   85          90          95

45 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
   100         105         110

50 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
   115         120         125

55 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
   130         135         140

   Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
   145         150         155         160

60 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

```

	165	170	175
5	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile 180 185 190		
	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe 195 200 205		
10	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 210 215 220		
15	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys 225 230 235 240		
20	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp 245 250 255		
25	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser 260 265 270		
30	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 275 280 285		
35	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 290 295 300		
40	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 305 310 315 320		
45	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 325 330 335		
50	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr 340 345 350		
55	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly 355 360 365		
60	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 370 375 380		
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 385 390 395 400		
	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser 405 410 415		

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430
 5
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445
 10 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460
 15 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 20 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 500 505 510
 25 Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 515 520 525
 30 Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
 530 535 540
 35 Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 545 550 555 560
 Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr
 565 570 575
 40 Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys
 580 585 590
 45 Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala
 595 600 605
 50 Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val
 610 615 620
 55 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 625 630 635 640
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 645 650 655
 60 Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser

	660	665	670	
5	Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu			
	675	680	685	
10	Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	690	695	700	
	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val			
	705	710	715	720
15	Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn			
		725	730	735
20	Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln			
		740	745	750
25	Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
		755	760	765
30	Lys Arg			
	770			
35	<210> 194			
	<211> 2301			
	<212> DNA			
	<213> Sequência artificial			
40	<220>			
	<223> Polinucleotídeo sintético			
	<220>			
	<223> 2H7sscIgG1-H7-2e12HL (DNA)			
	<400> 194			
	aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaata cagtgcattca			60
45	gtcataatgt ccagaggaca aattgtttctc tcccagtcctc cagcaatcct gtctgcatct			120
	ccaggggaga aggtcacaaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg			180
	taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctgggt			240
50	tctggagtc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc			300
	agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca			360
55	cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt			420
	ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg			480
	aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac			540
60	aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat			600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
 5 gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
 gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actgggtactt cgatgtctgg 780
 ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
 10 acatccccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtcctt cctcttcccc 900
 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggtg 960
 15 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 1020
 cataatgcc aagacaaagc gggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
 gtctctaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1140
 20 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
 gaaccacagg tgtacaccct gcccctatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
 25 ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatcca agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
 gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
 ttctcttaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
 30 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
 ccgggtaagg ggtgtccacc ttgtccgaat tctcaggtgc agctgaagga gtcagggcct 1560
 35 ggcagcgtgg cgcctcaca gagcctgtcc atcacatgca ccgtctcagg gttctcatta 1620
 accggctatg gtgtaaactg ggttcgccag cctccaggaa agggctctga gtggctggga 1680
 atgatatggg gtgatggaag cacagactat aattcagctc tcaaatccag actatcgatc 1740
 40 accaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac 1800
 acagccagat actactgtgc tcgagatggt tatagtaact ttcattacta tgttatggac 1860
 45 tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctctgggg gtggaggctc tgggtggcgt 1920
 ggatccggcg gaggtgggtc ggggtggcgc ggatctgaca ttgtgtcac ccaatctcca 1980
 gcttcttttg ctgtgtctct aggtcagaga gccaccatct cctgcagagc cagtgaaggt 2040
 50 gttgaatatt atgtcacaag tttaatgcag tggtaaccaac agaaaccagg acagccccc 2100
 aagctcctca tctctgtgtc tagcaacgta gaatctgggg tccctgccag gtttagtggc 2160
 55 agtgggtctg ggacagactt tagcctcaac atccatcctg tggaggagga tgatattgca 2220
 atgtatttct gtcagcaaag taggaagggt ccatggacgt tcgggtggagg caccaagctg 2280
 gaaatcaaac gttaatctag a 2301

60

<210> 195

```

    <211> 760
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial
5   <220>
    <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
    <223> 2H7sscIgG1-H7-2e12HL (w/2e12 Ligante ) (AA)
10
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(22)
    <223> Líder
15
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (23)..(128)
    <223> VL
20
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (129)..(144)
    <223> Ligante
25
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (145)..(265)
    <223> VH
30
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (268)..(282)
    <223> Dobradiça
35
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (500)..(507)
    <223> Ligante de EFD-BD2
40
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (508)..(628)
    <223> VH2
45
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (629)..(648)
    <223> Ligante2
50
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (649)..(760)
    <223> VL2
55
    <400> 195

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1           5           10           15
60

```

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

5 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

10 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

15 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

20 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

25 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

30 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

35 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

40 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

45 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

50 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

55 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

60 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser

	260	265	270
5	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 275 280 285		
	Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 290 295 300		
10	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 305 310 315 320		
15	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 325 330 335		
20	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr 340 345 350		
25	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly 355 360 365		
	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 370 375 380		
30	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 385 390 395 400		
35	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser 405 410 415		
40	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu 420 425 430		
45	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro 435 440 445		
	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val 450 455 460		
50	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met 465 470 475 480		
55	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser 485 490 495		
60	Pro Gly Lys Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys 500 505 510		

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr
 515 520 525
 5
 Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val
 530 535 540
 10 Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly
 545 550 555 560
 15 Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile
 565 570 575
 Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu
 580 585 590
 20 Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser
 595 600 605
 25 Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 610 615 620
 30 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 625 630 635 640
 35 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 645 650 655
 Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg
 660 665 670
 40 Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr
 675 680 685
 45 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser
 690 695 700
 50 Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 705 710 715 720
 55 Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala
 725 730 735
 Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 740 745 750
 60 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

	755	760	
	<210> 196		
5	<211> 2283		
	<212> DNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> Polinucleotídeo sintético		
	<220>		
	<223> 2H7sssIgG1-H7-G194 HL (DNA)		
15	<400> 196		
	aagcttgccg ccatggattt tcaagtcag attttcagct tctgctaata cagtgcctca	60	
	gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tccagtcctc cagcaatcct gtctgcatct	120	
20	ccaggggaga aggtcacaaat gacttcagag gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg	180	
	taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccttgattt atgccccatc caacctggct	240	
	tctggagtcc ctgctcgett cagtggcagt gggctcggga cctcttactc tctcacaatc	300	
25	agcagagtgg aggtgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca	360	
	cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt	420	
30	ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg	480	
	aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac	540	
	aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat	600	
35	ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta	660	
	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagcagc tgacatctga agactctgcg	720	
40	gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg	780	
	ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac	840	
	acatccccac cgtgccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtctt cctcttcccc	900	
45	ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg	960	
	gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg	1020	
50	cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc	1080	
	gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	1140	
	aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	1200	
55	gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc	1260	
	ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatcca agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	1320	
60	gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	1380	

```

    ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
    tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
5    ccgggtaagg ggtgtccacc ttgtccgaat tctgaggtcc agctgcaaca gtctggacct 1560
    gaactggtga agcctggagc ttcaatgaag atttcctgca aggcctctgg ttactcattc 1620
    actggctaca tcgtgaactg gctgaagcag agccatggaa agaaccttga gtggattgga 1680
10   cttattaatc catacaaagg tcttactacc tacaaccaga aattcaaggg caaggccaca 1740
    ttaactgtag acaagtcatc cagcacagcc tacatggagc tcctcagtct gacatctgaa 1800
    gactctgcag tctattactg tgcaagatct ggggtactatg gtgactcgga ctgggtacttc 1860
    gatgtctggg gcgcagggac cacggtcacc gtctcctctg gtggcgggtg ctcgggcggt 1920
    ggtggatctg gaggaggtgg gagcgctagc gacatccaga tgacacagac tacatcctcc 1980
20   ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc atcagttgca gggcaagtca ggacattcgc 2040
    aattatttaa actggtatca gcagaaacca gatggaactg ttaaactcct gatctactac 2100
    acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat 2160
    tattctctca ccattgccaa cctgcaacca gaagatattg ccacttactt ttgccaacag 2220
    ggtaatacgc ttccgtggac gttcgggtga ggcaccaaac tggtaaccaa acggtaatct 2280
30   aga 2283

    <210> 197
35   <211> 754
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial

    <220>
40   <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
    <223> 2H7sssIgG1-H7-G194 HL (w/2e12 Líder) (AA)

45   <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(22)
    <223> Líder

50   <220>
    <221> misc_característica
    <222> (23)..(128)
    <223> VL

55   <220>
    <221> misc_característica
    <222> (129)..(144)
    <223> Ligante

60   <220>
    <221> misc_característica

```

```

    <222> (145)..(265)
    <223> VH1

    <220>
  5  <221> misc_característica
    <222> (268)..(282)
    <223> Dobradiça

    <220>
  10 <221> misc_característica
    <222> (500)..(507)
    <223> Ligante de EFD-BD2

    <220>
  15 <221> misc_característica
    <222> (508)..(629)
    <223> VH2

    <220>
  20 <221> misc_característica
    <222> (630)..(646)
    <223> Ligante2

    <220>
  25 <221> misc_característica
    <222> (647)..(754)
    <223> VL2

    <400> 197
  30
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
  1          5          10          15

  35 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
      20          25          30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
  40      35          40          45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
  45      50          55          60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
  65      70          75          80

  50 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
      85          90          95

  55 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
      100          105          110

  60 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
      115          120          125

```


Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 130 135 140
 5
 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
 145 150 155 160
 10 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 165 170 175
 15 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 180 185 190
 20 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 195 200 205
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220
 25 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 225 230 235 240
 30 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255
 35 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
 260 265 270
 40 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 275 280 285
 Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300
 45 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 305 310 315 320
 50 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335
 55 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350
 60 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380

5 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415

10 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430

15 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445

20 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460

25 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495

30 Pro Gly Lys Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln
 500 505 510

35 Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser
 515 520 525

40 Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Ile Val Asn Trp Leu
 530 535 540

45 Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro
 545 550 555 560

Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
 565 570 575

50 Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser
 580 585 590

55 Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr
 595 600 605

60 Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
 610 615 620

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 625 630 635 640
 5
 Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
 645 650 655
 10 Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 660 665 670
 15 Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
 675 680 685
 20 Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
 690 695 700
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
 705 710 715 720
 25 Ile Ala Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
 725 730 735
 30 Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Val Thr
 740 745 750
 35 Lys Arg
 40 <210> 198
 <211> 2298
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 45 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 <220>
 <223> 2H7sssIgG1-H7-G281 HL (DNA)
 50 <400> 198
 aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tccctgctaatt cagtgtttca 60
 gtcataatgt ccagaggaca aattgtttctc tcccagtcct cagcaatcct gtctgcatct 120
 ccaggggaga aggtcacaaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
 55 taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccttgattt atgccccatc caacctggct 240
 tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc 300
 60 agcagagtgg aggtgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

	cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt	420
	ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtgggtg	480
5	aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac	540
	aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat	600
10	ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta	660
	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagcagc tgacatctga agactctgcg	720
	gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg	780
15	ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac	840
	acatccccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtctt cctcttcccc	900
20	ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg	960
	gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg	1020
	cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	1080
25	gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	1140
	aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	1200
30	gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc	1260
	ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatcca agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	1320
	gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	1380
35	ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1440
	tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct	1500
40	ccgggtaagg ggtgtccacc ttgtccgaat tctgaggtcc agctgcaaca gtctggacct	1560
	gaactggtga agcctggagc ttcaatgaag atttctctga aggcctctgg ttactcattc	1620
	actggctaca tcgtgaactg gctgaagcag agccatggaa agaaccttga gtggattgga	1680
45	cttattaatc catacaaagg tcttactacc tacaaccaga aattcaagg caaggccaca	1740
	ttaactgtag acaagtcac cagcacagcc tacatggagc tcctcagtct gacatctgaa	1800
50	gactctgcag tctattactg tgcaagatct ggggtactatg gtgactcgga ctggtacttc	1860
	gatgtctggg gcgcagggac caggtcacc gtctcctctg gtggcggtgg ctcgggcggt	1920
	ggtggatctg gaggagggtg gagcggggga ggtggcagtg ctacgcacat ccagatgaca	1980
55	cagactacat cctccctgtc tgcctctctg ggagacagag tcaccatcag ttgcagggca	2040
	agtcaggaca ttgcgaatta tttaaactgg tatcagcaga aaccagatgg aactgttaaa	2100
60	ctcctgatct actacacatc aagattacac tcaggagtcc catcaagggt cagtggcagt	2160
	gggtctggaa cagattattc tctcaccatt gccaacctgc aaccagaaga tattgccact	2220

```

tacttttgcc aacagggttaa tacgcttccg tggacgttcg gtggaggcac caaactggta 2280
accaaacggt aatctaga 2298
5
<210> 199
<211> 759
<212> PRT
10 <213> Sequência artificial

<220>
<223> Polipeptídeo sintético

15 <220>
<223> 2H7sssIgG1-H7-G281 HL (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
20 <221> misc_característica
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
25 <221> misc_característica
<222> (23)..(128)
<223> VL1

<220>
30 <221> misc_característica
<222> (129)..(144)
<223> Ligante

<220>
35 <221> misc_característica
<222> (145)..(265)
<223> VH1

<220>
40 <221> misc_característica
<222> (268)..(282)
<223> Dobradiça

<220>
45 <221> misc_característica
<222> (500)..(507)
<223> Ligante de EFD-BD2

<220>
50 <221> misc_característica
<222> (508)..(629)
<223> VH2

<220>
55 <221> misc_característica
<222> (630)..(651)
<223> Ligante2

<220>
60 <221> misc_característica
<222> (652)..(759)

```

<223> VL2

<400> 199

5 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

 10 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30

 15 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

 20 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

 25 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

 30 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

 35 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110

 40 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

 45 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 130 135 140

 50 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
 145 150 155 160

 55 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 165 170 175

 60 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 180 185 190

 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 195 200 205

 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220

 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

	225		230		235		240
5	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp	245		250		255	
	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser	260		265		270	
10	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	275		280		285	
15	Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	290		295		300	
20	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	305		310		315	320
25	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	325		330		335	
30	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	340		345		350	
35	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	355		360		365	
40	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	370		375		380	
45	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	385		390		395	400
50	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	405		410		415	
55	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	420		425		430	
60	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	435		440		445	
	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	450		455		460	
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	465		470		475	480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 5
 Pro Gly Lys Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln
 500 505 510
 10
 Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser
 515 520 525
 15
 Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Ile Val Asn Trp Leu
 530 535 540
 Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro
 545 550 555 560
 20
 Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
 565 570 575
 25
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser
 580 585 590
 30
 Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr
 595 600 605
 35
 Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
 610 615 620
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 625 630 635 640
 40
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr
 645 650 655
 45
 Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile
 660 665 670
 50
 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
 675 680 685
 55
 Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg
 690 695 700
 Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 705 710 715 720
 60
 Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr

		725		730		735	
5	Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly	740		745		750	
	Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg	755					
10	<210> 200						
	<211> 1533						
	<212> DNA						
	<213> Sequência artificial						
15	<220>						
	<223> Polinucleotídeo sintético						
	<220>						
20	<223> 2e12-sss-IgG1 HL SMIP (DNA)						
	<400> 200						
	atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc					60	
25	agaggagtcc aggtgcagct gaaggagtca ggacctggcc tgggtggcgcc ctcacagagc					120	
	ctgtccatca catgcaccgt ctcagggctc tcattaaccg gctatgggtg aaactggggt					180	
	cgccagcctc caggaaaggg tctagagtgg ctgggaatga tatgggggtga tggaagcaca					240	
30	gactataatt cagctctcaa atccagacta tcgatcacca aggacaactc caagagccaa					300	
	gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaaact gatgacacag ccagatacta ctgtgctcga					360	
35	gatgggttata gtaactttca ttactatgtt atggactact ggggtcaagg aacctcagtc					420	
	accgtctcct ctgggggtgg aggetctggt ggcggtggat ccggcggagg tgggtcgggt					480	
	ggcggcggat ctgacattgt gtcacccaa tctccagctt ctttggctgt gtctctaggt					540	
40	cagagagcca ccatctcctg cagagccagt gaaagtgttg aatattatgt cacaagtta					600	
	atgcagtggg accaacagaa accaggacag ccacccaaac tcctcatctc tgetgctagc					660	
45	aacgtagaat ctgggggtccc tgccaggttt agtggcagtg ggtctgggac agactttagc					720	
	ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg					780	
	aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaactga tcaggagccc					840	
50	aaatcttctg acaaaactca cacatcccca ccgtccccag cacctgaact cctgggggga					900	
	tcgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct					960	
55	gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg					1020	
	tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac					1080	
	agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactgggt gaatggcaag					1140	
60	gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccagcct ccatcgagaa aacaatctcc					1200	

```

aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1260
ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1320
5 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1380
ctggactccg acggtctctt cttctcttac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg 1440
10 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1500
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1533

```

```

15 <210> 201
    <211> 510
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial

```

```

20 <220>
    <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
    <223> 2e12-sss-IgG1 HL SMIP (AA)

```

```

25 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(22)
    <223> Líder

```

```

30 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (24)..(144)
    <223> VH

```

```

35 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (145)..(164)
    <223> Ligante

```

```

40 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (165)..(276)
    <223> VL

```

```

45 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (279)..(293)
    <223> Dobradiça

```

```

50 <400> 201

```

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10          15

```

```

55 Val Ile Met Ser Arg Gly Val Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro
    20          25          30

```

```

60 Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser

```

	35	40	45
5	Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro 50 55 60		
10	Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr 65 70 75 80		
15	Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn 85 90 95		
20	Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp 100 105 110		
25	Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr 115 120 125		
30	Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser 130 135 140		
35	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 145 150 155 160		
40	Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala 165 170 175		
45	Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser 180 185 190		
50	Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 195 200 205		
55	Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser 210 215 220		
60	Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser 225 230 235 240		
65	Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys 245 250 255		
70	Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 260 265 270		
75	Glu Ile Lys Arg Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr 275 280 285		

Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe
 290 295 300
 5 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 305 310 315 320
 10 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 325 330 335
 15 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 340 345 350
 20 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 355 360 365
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 370 375 380
 25 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 385 390 395 400
 30 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 405 410 415
 35 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 420 425 430
 40 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 435 440 445
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 450 455 460
 45 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 465 470 475 480
 50 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 485 490 495
 55 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500 505 510
 <210> 202
 <211> 1518
 <212> DNA
 60 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 <220>
 5 <223> 2e12-sss-IgG1 LH SMIP (DNA)
 <400> 202
 atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
 10 agaggagtcg acattgtgct caccacaatct ccagcttctt tggctgtgtc tctaggtcag 120
 agagccacca tctcctgcag agccagtga agtggtgaat attatgtcac aagtttaatg 180
 15 cagtgggtacc aacagaaacc aggacagcca cccaaactcc tcatctctgc tgctagcaac 240
 gtagaatctg gggtcctgc caggtttagt ggcagtgggt ctgggacaga ctttagcctc 300
 aacatccatc ctgtggagga ggatgatatt gcaatgtatt tctgtcagca aagtaggaag 360
 20 gttccatgga cgttcgggtg aggcaccaag ctggaaatca aacggggtg cgggtggatcc 420
 ggcggaggtg ggtcgggtg cggcgatct caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc 480
 ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc acatgcaccg tctcagggtt ctcatcaacc 540
 25 ggctatggtg taaactgggt tcgccagcct ccaggaaagg gtctagagtg gctgggaatg 600
 atatggggtg atggaagcac agactataat tcagctctca aatccagact atcgatcacc 660
 30 aaggacaact ccaagagcca agttttctta aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca 720
 gccagatact actgtgctcg agatgggttat agtaactttc attactatgt tatggactac 780
 tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc tctgatcagg agcccaaact ttctgacaaa 840
 35 actcacacat cccaccgtc ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 900
 ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 960
 40 gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 1020
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcyg gaggagcagt acaacagcac gtacctgtg 1080
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 1140
 45 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaaca tctccaaagc caaagggcag 1200
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccacccggg atgagctgac caagaaccag 1260
 50 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1320
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1380
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1440
 55 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1500
 ctgtctccgg gtaaatga 1518
 60 <210> 203

```

<211> 505
<212> PRT
<213> Sequência artificial

5  <220>
    <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
    <223> 2e12-sss-IgG1 LH SMIP (AA)
10
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(23)
    <223> Líder
15
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (24)..(135)
    <223> VL
20
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (136)..(150)
    <223> Ligante
25
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (151)..(271)
    <223> VH
30
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (274)..(288)
    <223> Dobradiça
35
    <400> 203

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10          15

40
Val Ile Met Ser Arg Gly Val Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
          20          25          30

45
Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
          35          40          45

50
Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
          50          55          60

55
Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn
65          70          75          80

Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
          85          90          95
60

```

	Asp	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Asp	Asp	Ile	Ala	Met	
				100					105						110		
5	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	
			115					120					125				
10	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
		130					135						140				
15	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	
	145					150					155					160	
20	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	
					165					170					175		
25	Phe	Ser	Leu	Thr	Gly	Tyr	Gly	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	
				180					185						190		
30	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Met	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Asp	
		195						200					205				
35	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Lys	Asp	Asn	Ser	
	210						215					220					
40	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	
	225					230					235					240	
45	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Tyr	Ser	Asn	Phe	His	Tyr	Tyr	
					245					250					255		
50	Val	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	
			260						265						270		
55	Gln	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	
			275					280					285				
60	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
	290						295					300					
65	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
	305					310					315					320	
70	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
					325					330					335		
75	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
			340						345					350			

5 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 355 360 365
 10 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 370 375 380
 15 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 385 390 395 400
 20 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 420 425 430
 25 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 435 440 445
 30 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 450 455 460
 35 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 485 490 495
 40 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500 505
 45 <210> 204
 <211> 1498
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 50 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 55 <400> 204
 aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgtact ctggctccca 60
 gataccaccg gtgacatcca gatgactcag tctccagcct ccctatctgc atctgtggga 120
 gagactgtca ccatcacatg tcgaacaagt gaaaatgttt acagttatatt ggcttggtat 180
 60 cagcagaaac agggaaaaac tcctcagctc ctggtctctt ttgcaaaaac cttagcagaa 240


```

gggtgtgcat caaggttcag tggcagtgga tcaggcacac agttttctct gaagatcagc 300
agcctgcagc ctgaagattc tggaagttat ttctgtcaac atcattccga taatccgtgg 360
5 acgttcggtg gaggcaccga actggagatc aaaggtggcg gtggctcggg cgggtggtgg 420
tcgggtggcg gcggatctgc tagcgcagtc cagctgcagc agtctggacc tgagctggaa 480
aagcctggcg cttcagtga gatttcctgc aaggcttctg gttactcatt cactggetac 540
10 aatatgaact ggggtgaagca gaataatgga aagagccttg agtggattgg aaatattgat 600
ccttattatg gtggtactac ctacaaccgg aagttcaagg gcaaggccac attgactgta 660
15 gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcaagagtc tgacatctga ggactctgca 720
gtctattact gtgcaagatc ggtcggccct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 780
accgtctcga gcgagcccaa atcttctgac aaaactcaca catgcccacc gtgccagca 840
20 cctgaactcc tgggtggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 900
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacctt 960
25 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 1020
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttcaccgt cctgcaccag 1080
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct ccagccccc 1140
30 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1200
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgect ggtcaaagcg 1260
ttctatccaa gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1320
35 aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc 1380
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1440
40 ctgcacaacc actacacgca gaagagctc tcctgtctc cgggtaagtg actctaga 1498

<210> 205
<211> 492
45 <212> PRT
    <213> Sequência artificial

    <220>
    <223> Polipeptídeo sintético
50
    <220>
    <223> G28-1 LH SMIP (AA)

    <220>
55 <221> misc_característica
    <222> (1)..(20)
    <223> Líder

    <220>
60 <221> misc_característica
    <222> (21)..(127)

```

```

<223> VL
<220>
<221> misc_característica
<222> (128)..(144)
5 <223> Ligante

<220>
<221> misc_característica
<222> (145)..(260)
10 <223> VH

<220>
<221> misc_característica
<222> (261)..(275)
15 <223> Dobradiça

<400> 205

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
20 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
25 20 25 30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn
30 35 40 45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Val Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser
35 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser
40 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser
45 100 105 110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser
50 130 135 140

Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
55 145 150 155 160

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
60 165 170 175

```

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 180 185 190
 5
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
 195 200 205
 10 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220
 15 Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 225 230 235 240
 20 Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 245 250 255
 Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270
 25 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 30 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 35 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320
 40 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350
 45 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365
 50 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380
 55 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400
 60 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

	420	425	430	
5	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	Gly Ser	
	435	440	445	
10	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln			
	450	455	460	
15	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His			
	465	470	475	480
20	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	485	490		
20	<210> 206			
	<211> 1522			
	<212> DNA			
	<213> Sequência artificial			
25	<220>			
	<223> Polinucleotídeo sintético			
30	<220>			
	<223> G28-1 HL SMIP (DNA)			
35	<400> 206			
	aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tctgctact ctggctccca	60		
	gataccaccg gtgcggtcca gctgcagcag tctggacctg agtcggaaaa gcctggcgct	120		
	tcagtgaaga tttctctcaa ggcttctggt tactcattca ctggctacaa tatgaactgg	180		
	gtgaagcaga ataatggaaa gagccttgag tggattggaa atattgatcc ttattatggt	240		
40	gggtactacct acaaccggaa gttcaagggc aaggccacat tgactgtaga caaatcctcc	300		
	ggcacagcct acatgcagct caagagtctg acatctgagg actctgcagt ctattactgt	360		
45	gcaagatcgg tcggccctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcttct	420		
	gggtggcggtg gctcgggcgg tgggtgggtcg ggtggcggcg gatcaggagg aggcgggagt	480		
	gctagcgaca tccagatgac tcagtctcca gcctccctat ctgcatctgt gggagagact	540		
50	gtcaccatca catgtcgaac aagtgaaaat gtttacagtt atttggcttg gtatcagcag	600		
	aaacagggaa aatctcctca gctcctggtc tcttttgcaa aaaccttagc agaaggtgtg	660		
55	ccatcaagggt tcagtggcag tggatcaggc acacagtttt ctctgaagat cagcagcctg	720		
	cagcctgaag attctggaag ttattttctgt caacatcatt ccgataatcc gtggacgttc	780		
	gggtggaggca ccgaactgga gatcaaaggc tcgagcgagc ccaaattcttc tgacaaaact	840		
60	cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctctggggtg gaccgtcagt cttcctcttc	900		

```

cccccaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg      960
gtggacgtga gccacgaaga cctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag    1020
5  gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc    1080
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc    1140
10 tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc    1200
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc    1260
agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctat ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc    1320
15 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc    1380
ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc    1440
20 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg    1500
tctccgggta agtgactcta ga                                             1522

<210> 207
25 <211> 500
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial

    <220>
30 <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
    <223> G28-1 HL SMIP (AA)

35 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(20)
    <223> Líder

40 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (21)..(136)
    <223> VH

45 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (137)..(158)
    <223> Ligante

50 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (159)..(266)
    <223> VL

55 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (268)..(283)
    <223> Dobradiça

60 <400> 207

```

	Met	Glu	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro	
	1				5				10						15		
5	Asp	Thr	Thr	Gly	Ala	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Ser	Glu	
				20					25					30			
10	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	
			35					40					45				
15	Phe	Thr	Gly	Tyr	Asn	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Asn	Asn	Gly	Lys	Ser	
		50					55					60					
20	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Asn	Arg	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	
					85					90					95		
30	Gly	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	
				100					105					110			
35	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Val	Gly	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			115					120					125				
40	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
			130					135					140				
45	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Asp	Ile	
	145					150					155					160	
50	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	
					165					170					175		
55	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asn	Val	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	
				180					185					190			
60	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val	Ser	Phe	
			195					200					205				
65	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	
		210					215					220					
70	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	
	225					230					235				240		
75	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	His	Ser	Asp	Asn	Pro	Trp	Thr	Phe	
				245						250					255		

Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Gly Ser Ser Glu Pro Lys Ser
 260 265 270
 5

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 275 280 285

10 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300

15 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320

20 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335

25 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365

30 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 370 375 380

35 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400

40 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430

45 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445

50 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460

55 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

60 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495

Ser Pro Gly Lys
500

<210> 208
<211> 1522
<212> DNA
<213> Sequência artificial

10 <220>
<223> Polinucleotídeo sintético

<220>
<223> G19-4 LH SMIP (DNA)

15 <400> 208
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tctgtctact ctggctccca 60
gataccaccg gtgacatcca gatgacacag actacatcct ccctgtctgc ctctctggga 120
20 gacagagtca ccatcagttg cagggcaagt caggacattc gcaattattt aaactgggat 180
cagcagaaac cagatggaac tgttaaactc ctgatctact acacatcaag attacactca 240
25 ggagtcccat caaggttcag tggcagtggt tctggaacag attattctct caccattgcc 300
aacctgcaac cagaagatat tgccacttac ttttgccaac agggtaatac gcttccgtgg 360
acgttcggtg gaggcaccaa actggtaacc aaacgggggtg gcggtggctc gggcggtggg 420
30 ggatctggag gaggtgggag cgctagcgag gtccagctgc aacagtctgg acctgaactg 480
gtgaagcctg gagcttcaat gaagatttcc tgcaaggcct ctgggtactc attcactggc 540
35 tacatcgtga actggctgaa gcagagccat ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt 600
aatccataca aaggtcttac tacctacaac cagaaattca agggcaaggc cacattaact 660
gtagacaagt catccagcac agcctacatg gagctcctca gtctgacatc tgaagactct 720
40 gcagtctatt actgtgcaag atctgggtac tatggtgact cggactggta cttcgatgtc 780
tggggcgagc ggaccacggt caccgtctcc tcgagcgagc ccaaattctc tgacaaaact 840
45 cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcttggtg gaccgtcagt ctctctcttc 900
cccccaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggtg 960
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1020
50 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1080
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1140
55 tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1200
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1260
agcctgacct gcctgggtcaa aggtctctat ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1320
60 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1380

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1440
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1500
 5 tctccgggta agtgactcta ga 1522

<210> 209
 10 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 15 <223> Polipeptídeo sintético

<220>
 <223> G19-4 LH SMIP (AA)

20 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(20)
 <223> Líder

25 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (21)..(128)
 <223> VL

30 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (129)..(145)
 <223> Ligante

35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (146)..(267)
 <223> VH

40 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (268)..(282)
 <223> Dobradiça

45 <400> 209
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

50 Asp Thr Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

55 Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
 35 40 45

60 Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
 50 55 60

	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
	65					70					75					80	
5	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ala	
				85						90					95		
10	Asn	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	
				100					105					110			
15	Thr	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Val	Thr	Lys	Arg	
			115					120					125				
20	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	
		130					135					140					
25	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	
	145					150					155					160	
30	Ala	Ser	Met	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	
					165					170						175	
35	Tyr	Ile	Val	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Asn	Leu	Glu	Trp	
				180					185					190			
40	Ile	Gly	Leu	Ile	Asn	Pro	Tyr	Lys	Gly	Leu	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	
		195						200					205				
45	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	
	210						215					220					
50	Tyr	Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	
	225					230					235					240	
55	Cys	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Ser	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	
					245					250					255		
60	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	
				260					265					270			
65	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
		275						280					285				
70	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
		290					295					300					

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320

5 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335

10 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350

15 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365

20 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 370 375 380

25 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400

30 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415

35 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430

40 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445

45 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460

50 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

55 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495

Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 210
 <211> 1525
 <212> DNA
 55 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

60 <220>
 <223> G19-4 HL SMIP (DNA)

<400> 210
 aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tctgtctact ctggctccca 60
 5 gataccaccg gtgaggtcca gctgcaacag tctggacctg aactggtgaa gcctggagct 120
 tcaatgaaga tttcttgcaa ggctctggt tactcattca ctggctacat cgtgaactgg 180
 ctgaagcaga gccatggaaa gaaccttgag tggattggac ttattaatcc atacaaaggt 240
 10 cttactacct acaaccagaa attcaagggc aaggccacat tgactgtaga caagtcattc 300
 agcacagcct acatggagct cctcagtcgt acatctgaag actctgcagt ctattactgt 360
 15 gcaagatctg ggtactatgg tgactcagac tggctactcg atgtctgggg cgcagggacc 420
 acagtcaccg tctcctctgg cggcggtggc tcggcggtg gtggatctgg aggaggtggg 480
 agcgctagcg acatccagat gacacagact acatcctccc tgtctgcctc tctgggagac 540
 20 agagtcacca tcagttgcag ggcaagtcag gacattcgca attatttgaa ctggtatcag 600
 cagaaaccag atggaactgt taaactctg atctactaca catcaagact aactcagga 660
 25 gtcccatcaa ggttcagtg cagtgggtct ggaacagatt attctctcac cattgccaac 720
 ctgcaaccag aagatattgc cacttacttt tgccaacagg gtaatacact tccctggacg 780
 ttcggtggag ggaccaaact ggtgaccaa cgctcgagcg agcccaaata ttctgacaaa 840
 30 actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg gtggaccgtc agtcttcttc 900
 tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 960
 35 gtggtggacg tgagccaaga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 1020
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1080
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1140
 40 gtctccaaca aagccctccc agccccata gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1200
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1260
 45 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccaagcg acatcgccgt ggagtgggag 1320
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1380
 tccttcttcc tctacagaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1440
 50 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1500
 ctgtctccgg gtaagtgact ctaga 1525
 55
 <210> 211
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 60
 <220>

<223> Polipeptídeo sintético
 <220>
 <223> G19-4 HL SMIP (AA)
 5
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(20)
 <223> Líder
 10
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (21)..(142)
 <223> VH
 15
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (143)..(159)
 <223> Ligante
 20
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (160)..(267)
 <223> VL
 25
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (270)..(284)
 <223> Dobradiça
 30
 <400> 211
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 35
 Asp Thr Thr Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val
 20 25 30
 40
 Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 35 40 45
 45
 Phe Thr Gly Tyr Ile Val Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Asn
 50 55 60
 50
 Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
 85 90 95
 55
 Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110
 60
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr
 115 120 125

Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 130 135 140
 5 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp
 145 150 155 160
 10 Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 165 170 175
 15 Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu
 180 185 190
 20 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 195 200 205
 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 210 215 220
 25 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gln Pro Glu
 225 230 235 240
 30 Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
 245 250 255
 35 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg Ser Ser Glu Pro Lys
 260 265 270
 40 Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 275 280 285
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 290 295 300
 45 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 305 310 315 320
 50 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 325 330 335
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 340 345 350
 55 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 355 360 365
 60 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

	370	375	380	
5	Pro Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	385	390	395	400
10	Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
		405	410	415
15	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
		420	425	430
20	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
		435	440	445
25	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu			
		450	455	460
30	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			
		465	470	475
35	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
		485	490	495
40	Leu Ser Pro Gly Lys			
		500		
45	<210> 212			
	<211> 2328			
	<212> DNA			
	<213> Sequência artificial			
50	<220>			
	<223> Polinucleotídeo sintético			
55	<220>			
	<223> n2H7sssIgG1-STD1-2e12HL (DNA)			
60	<400> 212			
	aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tctgtctact ctggctccca			60
50	gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tctgtctgc atctccaggg			120
	gagaagggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag			180
55	cagaagccag gatcctcccc caaaccttg atttatgcc catccaacct ggcttctgga			240
	gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga			300
	gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccaccacg			360
60	ttcgggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcgggtg gtcggggcgg tgggtgatct			420

	ggaggaggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct	480
	ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg	540
5	cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga	600
	aatggtgata ctctctacaa tcagaagttc aagggaagg ccacactgac tgtagacaaa	660
10	tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat	720
	ttctgtgcaa gagtgggtga ctatagtaac tcttactggg acttcgatgt ctggggcaca	780
	gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca	840
15	ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc	900
	aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc	960
20	cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1020
	aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc	1080
	gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc	1140
25	ctcccagccc ccctcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagcccgc agaaccacag	1200
	gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	1260
30	ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	1320
	gagaacaact acaagaccac gctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac	1380
	agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg	1440
35	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaag	1500
	aattatggtg gcggtggctc gggcgggtgt ggatctggag gaggtgggag tgggaattct	1560
40	caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc	1620
	acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc ggctatggtg taaactgggt tcgccagcct	1680
	ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg atggaagcac agactataat	1740
45	tcagctctca aatccagact atcgatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttctta	1800
	aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccagatact actgtgctcg agatgggttat	1860
50	agtaactttc attactatgt tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc	1920
	tctgggggtg gaggtctctg tggcgggtga tccggcggag gtgggtcggg tggcggcgga	1980
	tctgacattg tgctaccca atctccagct tctttggtg tgtctctagg tcagagagcc	2040
55	accatctcct gcagagccag tgaaagtgtt gaatattatg tcacaagttt aatgcagtgg	2100
	taccaacaga aaccaggaca gccacccaaa ctctcatct ctgctgctag caacgtagaa	2160
60	tctgggggtc ctgccaggtt tagtggcagt ggggtctggga cagactttag cctcaacatc	2220
	catcctgtgg aggaggatga tattgcaatg tatttctgtc agcaaagtag gaaggttcca	2280

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgtt aatctaga

2328

5 <210> 213
 <211> 769
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

10 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético

15 <220>
 <223> n2H7sssIgG1-STD1-2e12HL (AA)

20 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(20)
 <223> Líder

25 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (21)..(127)
 <223> VL

30 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (128)..(142)
 <223> Ligante

35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (143)..(264)
 <223> VH

40 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (265)..(279)
 <223> Dobradiça

45 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (497)..(516)
 <223> Ligante de EFD-BD2

50 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (517)..(637)
 <223> VH2

55 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (638)..(657)
 <223> Ligante2

60 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (658)..(769)
 <223> VL2

<400> 213

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

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
 245 250 255
 5 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 260 265 270
 10 His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 275 280 285
 15 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 290 295 300
 20 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 305 310 315 320
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 325 330 335
 25 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 340 345 350
 30 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 355 360 365
 35 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 370 375 380
 40 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 385 390 395 400
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415
 45 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430
 50 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 435 440 445
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 450 455 460
 55 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480
 60 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

	485	490	495
5	Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 500 505 510		
10	Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val 515 520 525		
15	Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser 530 535 540		
20	Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly 545 550 555 560		
25	Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn 565 570 575		
30	Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser 580 585 590		
35	Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg 595 600 605		
40	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met 610 615 620		
45	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly 625 630 635 640		
50	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 645 650 655		
55	Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu 660 665 670		
60	Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr 675 680 685		
	Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro 690 695 700		
	Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro 705 710 715 720		
	Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile 725 730 735		

His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser
740 745 750

5 Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
755 760 765

10 Arg

15 <210> 214
<211> 2313
<212> DNA
<213> Sequência artificial

20 <220>
<223> Polinucleotídeo sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-STD2-2e12LH (DNA)

25 <400> 214
aagcttgccg ccattggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60
gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg 120
30 gagaagggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180
cagaagccag gatcctcccc caaaccttg atttatgccc catecaacct ggcttctgga 240
gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300
35 gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccaccacg 360
ttcgggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcgg tgggtgatct 420
40 ggaggagggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480
ggggcctcag tgaagatgct ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540
cactgggttaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600
45 aatggtgata cttctacaa tcagaagttc aagggaagg ccacactgac tgtagacaaa 660
tcctccagca cagctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720
50 ttctgtgcaa gagtgggtga ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca 780
gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca 840
ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 900
55 aaggacaccc tcattgatctc ccggaccctc gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 960
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020
60 aagacaaagc cgcggggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc 1080

```

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc 1140
ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200
5 gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccgctg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380
10 agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500
15 aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggag gaggtgggag tgggaattct 1560
gacattgtgc tcacccaatc tccagcttct ttggtgtgt ctctaggtca gagagccacc 1620
atctcctgca gagccagtga aagtgttgaa tattatgtca caagtttaac gcagtgttac 1680
20 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctctg ctgctagcaa cgtagaatct 1740
ggggtccctg ccagggttag tggcagtggt tctgggacag actttagcct caacatccat 1800
25 cctgtggagg aggatgatat tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggaa ggttccatgg 1860
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgggggtg gcggtggatc cggcggaggt 1920
gggtcgggtg gcggcggatc tcaggtgcag ctgaaggagt caggacctgg cctggtggcg 1980
30 ccctcacaga gcctgtccat cacatgcacc gtctcagggt tctcattaac cggctatggt 2040
gtaaactggg ttccgcagcc tccaggaaag ggtctggagt ggctgggaat gatatggggt 2100
35 gatggaagca cagactataa ttcagctctc aaatccagac tatcgatcac caaggacaac 2160
tccaagagcc aagttttctt aaaaatgaac agtctgcaaa ctgatgacac agccagatac 2220
tactgtgctc gagatgggta tagtaacttt cactactatg ttatggacta ctggggtcaa 2280
40 ggaacctcag tcaccgtctc ctcttaatct aga 2313

```

```

45 <210> 215
    <211> 764
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial

    <220>
50 <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
    <223> n2H7sssIgG1-STD2-2e12LH (AA)

55 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(20)
    <223> Líder

60 <220>
    <221> misc_característica

```

```

<222> (21)..(126)
<223> VL

<220>
5 <221> misc_característica
  <222> (127)..(142)
  <223> Ligante

<220>
10 <221> misc_característica
   <222> (143)..(264)
   <223> VH

<220>
15 <221> misc_característica
   <222> (265)..(279)
   <223> Dobradiça

<220>
20 <221> misc_característica
   <222> (497)..(516)
   <223> Ligante de EFD-BD2

<220>
25 <221> misc_característica
   <222> (517)..(628)
   <223> VL2

<220>
30 <221> misc_característica
   <222> (629)..(643)
   <223> Ligante

<220>
35 <221> misc_característica
   <222> (644)..(764)
   <223> VH2

<400> 215
40 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
    1          5          10          15

45 Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
    20          25          30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
50          35          40          45

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
55          50          55          60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65          70          75          80

60 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg

```

	85	90	95
5	Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe 100 105 110		
10	Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly 115 120 125		
15	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala 130 135 140		
20	Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val 145 150 155 160		
25	Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met 165 170 175		
30	His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala 180 185 190		
35	Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly 195 200 205		
40	Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln 210 215 220		
45	Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg 225 230 235 240		
50	Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr 245 250 255		
55	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr 260 265 270		
60	His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser 275 280 285		
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg 290 295 300		
	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro 305 310 315 320		
	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala 325 330 335		

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 340 345 350
 5
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 355 360 365
 10 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 370 375 380
 15 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 385 390 395 400
 20 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430
 25 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 435 440 445
 30 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 450 455 460
 35 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480
 40 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490 495
 Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 500 505 510
 45 Ser Gly Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 515 520 525
 50 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 530 535 540
 Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 545 550 555 560
 55 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
 565 570 575
 60 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser

	580	585	590
5	Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys 595 600 605		
10	Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 610 615 620		
15	Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly 625 630 635 640		
20	Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala 645 650 655		
25	Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu 660 665 670		
30	Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu 675 680 685		
35	Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser 690 695 700		
40	Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln 705 710 715 720		
45	Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr 725 730 735		
50	Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp 740 745 750		
55	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser 755 760		
60	<210> 216 <211> 2048 <212> DNA <213> Sequência artificial <220> <223> Polinucleotídeo sintético <220> <223> n2H7sssIgG1-H1-2e12HL (DNA) <400> 216 aagcttgccg ccattggaagc accagcgcag cttctcttcc tctgtctact ctggctccca		60

	gataccaccg	gtcaaattgt	tctctcccag	tctccagcaa	tctgtctgc	atctccagg	120
	gagaagggtca	caatgacttg	cagggccagc	tcaagtgtaa	gttacatgca	ctgggtaccag	180
5	cagaagccag	gacccctccc	caaaccctgg	atztatgccc	catccaacct	ggcttctgga	240
	gtccctgctc	gcttcagtg	cagtgggtct	gggacctctt	actctctcac	aatcagcaga	300
	gtggaggctg	aagatgctgc	cacttattac	tgccagcagt	ggagttttaa	ccccccacg	360
10	ttcgggtgctg	ggaccaagct	ggagctgaaa	gatggcggtg	gctcgggcgg	tggtggatct	420
	ggaggagggtg	gagctagcca	ggcttatcta	cagcagtctg	gggctgagct	ggtgaggcct	480
15	ggggcctcag	tgaagatgtc	ctgcaaggct	tctggctaca	catttaccag	ttacaatatg	540
	cactgggttaa	agcagacacc	tagacagggc	ctggaatgga	ttggagctat	ttatccagga	600
	aatggtgata	cttcctacaa	tcagaagttc	aagggcaagg	ccacactgac	tgtagacaaa	660
20	tctccagca	cagcctacat	gcagctcagc	agcctgacat	ctgaagactc	tgcggtctat	720
	ttctgtgcaa	gagtgggtga	ctatagtaac	tcttactgg	acttcgatgt	ctggggcaca	780
25	gggaccacgg	tcaccgtctc	gagcgagccc	aaatcttctg	acaaaactca	cacatcccca	840
	ccgagcccag	cacctgaact	cctgggggga	ccgtcagttc	tctcttccc	cccaaaacc	900
	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccct	gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	960
30	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	1020
	aagacaaagc	cgcgaggagga	gcagtacaac	agcacgtacc	gtgtggtcag	cgtcctcacc	1080
35	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	gagtacaagt	gcaaggctctc	caacaaagcc	1140
	ctcccagccc	ccatcgagaa	aacaatctcc	aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	1200
	gtgtacaccc	tgccccatc	ccgggatgag	ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	1260
40	ctgggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	1320
	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	ctggactccg	acggctcctt	cttctcttac	1380
45	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcagggtg	cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	1440
	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaag	1500
	aattctcagg	tgcagctgaa	ggagtcagga	cctggcctgg	tggcgccctc	acagagcctg	1560
50	tccatcacat	gcaccgtctc	agggttctca	ttaaccggct	atgggtgtaaa	ctgggttcgc	1620
	cagcctccag	gaaaggtctc	ggagtggctg	ggaatgatat	gggggtgatg	aagcacagac	1680
55	tataattcag	ctctcaaate	cagactatcg	atcaccaagg	acaactccaa	gagccaagtt	1740
	ttcttaaaaa	tgaacagtct	gcaaactgat	gacacagcca	gatactactg	tgctcgagat	1800
	ggttatagta	actttcatta	ctatgttatg	gactactggg	gtcaaggaac	ctcagtcacc	1860
60	gtctcctctg	gggggtggagg	ctctgggtggc	ggtggatccg	gcggaggtgg	gtcgggtggc	1920

```

ggcggatctg acattgtgct cacccaatct ccagcttctt tggctgtgtc tctaggtcag 1980
agagccacca tctctgcag agccagtga agtggtgaat attatgtcac aagtttaatg 2040
5  cagtggta 2048

<210> 217
10 <211> 751
   <212> PRT
   <213> Sequência artificial

<220>
15 <223> Polipeptídeo sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H1-2e12HL (AA)

20 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (1)..(20)
   <223> Líder

25 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (21)..(126)
   <223> VL

30 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (127)..(142)
   <223> Ligante

35 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (143)..(264)
   <223> VH

40 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (265)..(279)
   <223> Dobradiça

45 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (497)..(498)
   <223> Ligante de EFD-BD2

50 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (499)..(619)
   <223> VH2

55 <220>
   <221> misc_característica
   <222> (620)..(639)
   <223> Ligante2

60 <220>
   <221> misc_característica

```

<222> (640)..(751)

<223> VL2

<400> 217

5 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

10 Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

15 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
35 40 45

20 Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
50 55 60

25 Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65 70 75 80

30 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

35 Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
100 105 110

40 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
115 120 125

45 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
130 135 140

50 Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

55 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
165 170 175

60 His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
180 185 190

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

	Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg	
	225	230 235 240
5	Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr	
		245 250 255
10	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr	
		260 265 270
15	His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser	
		275 280 285
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
		290 295 300
20	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	
		305 310 315 320
25	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
		325 330 335
30	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
		340 345 350
35	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
		355 360 365
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
		370 375 380
40	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
		385 390 395 400
45	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
		405 410 415
50	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
		420 425 430
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
		435 440 445
55	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
		450 455 460
60	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
		465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490 495
 5

Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro
 500 505 510

10 Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 515 520 525

15 Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 530 535 540

20 Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala
 545 550 555 560

25 Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
 565 570 575

Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr
 580 585 590

30 Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr
 595 600 605

35 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 610 615 620

40 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 625 630 635 640

45 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
 645 650 655

Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val
 660 665 670

50 Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 675 680 685

55 Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
 690 695 700

60 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro
 705 710 715 720

Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys
 725 730 735

5 Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 740 745 750

10 <210> 218
 <211> 2292
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

15 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

<220>
 <223> n2H7sssIgG1-H2-2e12HL (DNA)

20 <400> 218
 aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcttgctact ctggctccca 60
 gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tctgtgtgc atctccaggg 120
 25 gagaaggcca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180
 cagaagccag gatcctcccc caaaccttg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240
 gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300
 30 gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccaccacg 360
 ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggg gctcgggcgg tgggtgatct 420
 35 ggaggagggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480
 ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540
 cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600
 40 aatggtgata ctctctacaa tcagaagttc aagggaagg ccacactgac tgtagacaaa 660
 tcttcagca cagctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720
 45 ttctgtgcaa gagtgggtga ctatagtaac tottactggt acttcgatgt ctggggcaca 780
 gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaaactca cacatcccca 840
 ccgagcccag cacctgaact cctgggggga cgcgcagtct tctcttccc ccaaaaaccc 900
 50 aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 960
 cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020
 55 aagacaaagc gcggggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc 1080
 gtctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc 1140
 ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200
 60 gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260


```

ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380
5 agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500
10 ggtggcggtg gctcggggaa ttctcaggtg cagctgaagg agtcaggacc tggcctggtg 1560
gcgccctcac agagcctgtc catcacatgc accgtctcag ggttctcatt aaccggctat 1620
gggtgtaaact gggttcgcca gcctocagga aaggggtctgg agtggctggg aatgatatgg 1680
15 ggtgatggaa gcacagacta taattcagct ctcaaatcca gactatcgat caccaaggac 1740
aactccaaga gccaaagtttt cttaaaaatg aacagtctgc aaactgatga cacagccaga 1800
20 tactactgtg ctcgagatgg ttatagtaac tttcattact atgttatgga ctactggggg 1860
caaggaacct cagtcaccgt ctctctggg ggtggaggct ctggtggcgg tggatccggc 1920
ggagggtgggt cgggtggcgg cggatctgac attgtgtcga cccaatctcc agcttctttg 1980
25 gctgtgtctc taggtcagag agccaccatc tcctgcagag ccagtgaag tgttgaatat 2040
tatgtcaciaa gtttaatgca gtggtaccaa cagaaaccag gacagccacc caaactcctc 2100
30 atctctgctg ctagcaacgt agaactctggg gtccttgcca ggtttagtgg cagtgggtct 2160
gggacagact ttagcctcaa catccatcct gtggaggagg atgatattgc aatgtatttc 2220
tgtcagcaaa gtaggaaggt tccatggacg ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa 2280
35 cgттаатcta ga 2292

```

```

40 <210> 219
    <211> 757
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial

    <220>
45 <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
    <223> n2H7sssIgG1-H2-2e12HL (AA)

50 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(20)
    <223> Líder

55 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (21)..(126)
    <223> VL

60 <220>
    <221> misc_característica

```

```

    <222> (127)..(142)
    <223> Ligante

    <220>
5    <221> misc_característica
    <222> (143)..(264)
    <223> VH

    <220>
10   <221> misc_característica
    <222> (265)..(279)
    <223> Dobradiça

    <220>
15   <221> misc_característica
    <222> (497)..(504)
    <223> Ligante de EFD-BD2

    <220>
20   <221> misc_característica
    <222> (505)..(625)
    <223> VH2

    <220>
25   <221> misc_característica
    <222> (626)..(645)
    <223> Ligante2

    <220>
30   <221> misc_característica
    <222> (646)..(757)
    <223> VL2

    <400> 219
35
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1          5          10          15

40   Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
          20          25          30

    Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
45          35          40          45

    Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
          50          55          60
50

    Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65          70          75          80

55   Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
          85          90          95

60   Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
          100          105          110

```


	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
	355	360 365
5	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
	370	375 380
10	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
	385	390 395 400
15	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
		405 410 415
20	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
		420 425 430
25	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
		435 440 445
30	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
		450 455 460
35	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
		465 470 475 480
40	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
		485 490 495
45	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly	
		500 505 510
50	Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val	
		515 520 525
55	Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro	
		530 535 540
60	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser	
		545 550 555 560
	Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp	
		565 570 575
	Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp	
		580 585 590
	Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His	
		595 600 605

Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 610 615 620
 5
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 625 630 635 640
 10
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
 645 650 655
 15
 Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
 660 665 670
 20
 Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys
 675 680 685
 25
 Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu
 690 695 700
 Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 705 710 715 720
 30
 Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe
 725 730 735
 35
 Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 740 745 750
 40
 Leu Glu Ile Lys Arg
 755
 <210> 220
 <211> 2298
 45 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 50
 <220>
 <223> n2H7sssIgG1-H3-2e12HL (DNA)
 <400> 220
 55 aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60
 gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg 120
 gagaagggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180
 60 cagaagccag gatcctcccc caaaccttgg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240

	gtccctgctc gcttcagtg gcttgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga	300
5	gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccacccacg	360
	ttcgggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcg ggtgggatct	420
	ggaggaggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagctctg gggctgagct ggtgaggcct	480
10	ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg	540
	cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga	600
15	aatgggtgata ctctctacaa tcagaagttc aagggcaagg ccacactgac tgtagacaaa	660
	tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat	720
	ttctgtgcaa gagtgggtga ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca	780
20	gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca	840
	ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc	900
25	aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc	960
	cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1020
	aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc	1080
30	gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc	1140
	ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	1200
35	gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	1260
	ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	1320
	gagaacaact acaagaccac gcctccgtg ctggactccg acggctcctt ctctctctac	1380
40	agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg	1440
	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag	1500
45	aattatggtg gcggtggctc tgggaattct caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc	1560
	ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc acatgcaccg tctcaggggt ctcattaacc	1620
	ggctatggtg taaactgggt tcgccagcct ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg	1680
50	atatggggtg atggaagcac agactataat tcagctctca aatccagact atcgatcacc	1740
	aaggacaact ccaagagcca agttttctta aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca	1800
55	gccagatact actgtgctcg agatgggttat agtaactttc attactatgt tatggactac	1860
	tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tctgggggtg gaggtctctg tggcggtgga	1920
	tccggcggag gtgggtcggg tggcgcgga tctgacattg tgctcaccga atctccagct	1980
60	tctttggctg tgtctctagg tcagagagcc accatctcct gcagagccag tgaaagtgtt	2040

```

gaatattatg tcacaagttt aatgcagtgg taccaacaga aaccaggaca gccacccaaa 2100
ctcctcatct ctgctgctag caacgtagaa tctgggggtcc ctgccagggt tagtggcagt 2160
5 ggggtctggga cagacttttag cctcaacatc catcctgtgg aggaggatga tattgcaatg 2220
tatttctgtc agcaaagtag gaaggttcca tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa 2280
atcaaacggt aatctaga 2298
10
<210> 221
<211> 759
<212> PRT
15 <213> Sequência artificial
<220>
<223> Polipeptídeo sintético
20 <220>
<223> n2H7sssIgG1-H3-2e12HL (AA)
<220>
<221> misc_característica
25 <222> (1)..(20)
<223> Líder
<220>
<221> misc_característica
30 <222> (21)..(126)
<223> VL
<220>
<221> misc_característica
35 <222> (127)..(142)
<223> Ligante
<220>
<221> misc_característica
40 <222> (143)..(264)
<223> VH
<220>
<221> misc_característica
45 <222> (265)..(279)
<223> Dobradiça
<220>
<221> misc_característica
50 <222> (497)..(506)
<223> Ligante de EFD-BD2
<220>
<221> misc_característica
55 <222> (507)..(627)
<223> VH2
<220>
<221> misc_característica
60 <222> (628)..(647)
<223> Ligante2

```

```

<220>
<221> misc_característica
<222> (648)..(759)
5 <223> VL2

<400> 221

10 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
   1           5           10           15

    Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
15           20           25           30

    Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
           35           40           45

20 Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
   50           55           60

25 Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
   65           70           75           80

30 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
   85           90           95

    Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
35           100          105          110

    Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
           115          120          125

40 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
   130          135          140

45 Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
   145          150          155          160

50 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
           165          170          175

    His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
55           180          185          190

    Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
           195          200          205

60 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln

```


	210	215	220
5	Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg 225 230 235 240		
10	Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr 245 250 255		
15	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr 260 265 270		
20	His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser 275 280 285		
25	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg 290 295 300		
30	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro 305 310 315 320		
35	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala 325 330 335		
40	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val 340 345 350		
45	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr 355 360 365		
50	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr 370 375 380		
55	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu 385 390 395 400		
60	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys 405 410 415		
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser 420 425 430		
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp 435 440 445		
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser 450 455 460		

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480
 5
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490 495
 10
 Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu
 500 505 510
 15
 Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys
 515 520 525
 20
 Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg
 530 535 540
 Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp
 545 550 555 560
 25
 Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr
 565 570 575
 30
 Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln
 580 585 590
 35
 Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn
 595 600 605
 40
 Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 610 615 620
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 625 630 635 640
 45
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 645 650 655
 50
 Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
 660 665 670
 Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
 675 680 685
 55
 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn
 690 695 700
 60
 Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

	705	710	715	720	
5	Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met	725	730	735	
10	Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly	740	745	750	
	Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	755			
15	<210> 222				
	<211> 2307				
	<212> DNA				
	<213> Sequência artificial				
20	<220>				
	<223> Polinucleotídeo sintético				
25	<220>				
	<223> n2H7sssIgG1-H4-2e12HL (DNA)				
	<400> 222				
	aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tctgctact ctggtccca				60
30	gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tctgtctgc atctocaggg				120
	gagaagggtc caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag				180
35	cagaagccag gatcctcccc caaaccttg atttatgccc catccaacct ggcttctgga				240
	gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga				300
	gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccaccacg				360
40	ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggg gctcgggcgg tgggtgatct				420
	ggaggagggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct				480
	ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg				540
45	cactgggttaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga				600
	aatggtgata cttcctacaa tcagaagttc aagggaagg ccacactgac tgtagacaaa				660
50	tctccagca cagctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat				720
	ttctgtgcaa gagtgggtgta ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca				780
	gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaaactca cacatcccca				840
55	ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc				900
	aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc				960
60	cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc				1020

```

aagacaaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc 1140
5 ctcccagccc ccctcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc 1260
10 ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccgct ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380
agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440
15 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500
gggtggcgggtg gctcgggcgg tgggtggatct ggggaattctc aggtgcagct gaaggagtca 1560
ggacctggcc tgggtggcgc ctcacagagc ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc 1620
20 tcattaaccg gctatggtgt aaactgggtt cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg 1680
ctgggaatga tatgggtga tggaagcaca gactataatt cagctctcaa atccagacta 1740
25 tcgatcacca aggacaactc caagagccaa gttttcttaa aatgaacag tctgcaaact 1800
gatgacacag ccagatacta ctgtgctcga gatggttata gtaactttca ttactatgtt 1860
atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ctgggggtgg aggtctctgt 1920
30 ggcggtggat ccggcggagg tgggtcgggt ggcggcggat ctgacattgt gtcacccaa 1980
tctccagctt ctttggtgt gtctctaggt cagagagcca ccatctcttg cagagccagt 2040
35 gaaagtgttg aatattatgt cacaagttta atgcagtggg accaacagaa accaggacag 2100
ccacccaaac tctcatctc tgctgctagc aacgtagaat ctgggggtccc tgccaggttt 2160
agtggcagtg ggtctgggac agacttttagc ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat 2220
40 attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc 2280
aagctggaaa tcaaacgtta atctaga 2307

45
<210> 223
<211> 762
<212> PRT
<213> Sequência artificial
50
<220>
<223> Polipeptídeo sintético

<220>
55 <223> n2H7sssIgG1-H4-2e12HL (AA)

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(20)
60 <223> Líder

```

```

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (21)..(126)
    <223> VL
5
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (127)..(142)
    <223> Ligante
10
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (143)..(264)
    <223> VH
15
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (265)..(279)
    <223> Dobradiça
20
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (497)..(509)
    <223> Ligante de EFD-BD2
25
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (510)..(630)
    <223> VH2
30
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (631)..(650)
    <223> Ligante2
35
    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (651)..(762)
    <223> VL2
40
    <400> 223

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1          5          10          15
45

Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
          20          25          30
50

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
          35          40          45
55

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
          50          55          60
60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65          70          75          80

```

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95
 5 Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
 100 105 110
 10 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
 115 120 125
 15 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
 130 135 140
 20 Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
 145 150 155 160
 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
 165 170 175
 25 His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
 180 185 190
 30 Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
 195 200 205
 35 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 210 215 220
 40 Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 225 230 235 240
 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
 245 250 255
 45 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 260 265 270
 50 His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 275 280 285
 55 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 290 295 300
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 305 310 315 320
 60 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

	325	330	335
5	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val 340 345 350		
10	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr 355 360 365		
15	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr 370 375 380		
20	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu 385 390 395 400		
25	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys 405 410 415		
30	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser 420 425 430		
35	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp 435 440 445		
40	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser 450 455 460		
45	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala 465 470 475 480		
50	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 485 490 495		
55	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln 500 505 510		
60	Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser 515 520 525		
65	Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn 530 535 540		
70	Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile 545 550 555 560		
75	Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu 565 570 575		

Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
 580 585 590

5

Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly
 595 600 605

10

Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 610 615 620

15

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 625 630 635 640

20

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln
 645 650 655

25

Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser
 660 665 670

30

Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln
 675 680 685

35

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala
 690 695 700

40

Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 705 710 715 720

45

Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp
 725 730 735

50

Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe
 740 745 750

55

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 755 760

60

<210> 224
 <211> 2313
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

<220>
 <223> n2H7sssIgG1-H5-2e12HL (DNA)

<400> 224

	aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgtctact ctggctccca	60
	gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg	120
5	gagaaggcca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag	180
	cagaagccag gatcctcccc caaaccttg atttatgccc catccaacct ggcttctgga	240
10	gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga	300
	gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccaccacg	360
	ttcgggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcgg tgggtgatct	420
15	ggaggagggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct	480
	ggggcctcag tgaagatgct ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg	540
20	cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga	600
	aatggtgata cttctacaa tcagaagttc aagggaagg ccacactgac tgtagacaaa	660
	tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcgggtctat	720
25	ttctgtgcaa gagtgggtga ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca	780
	gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg aaaaaactca cacatcccca	840
30	ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc	900
	aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc	960
	cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1020
35	aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc	1080
	gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc	1140
40	ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	1200
	gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc	1260
	ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	1320
45	gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac	1380
	agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg	1440
50	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag	1500
	aattatggtg gcgggtggctc gggcgggtgt ggatctggga attctcaggt gcagctgaag	1560
	gagtcaggac ctggcctggt ggcgccctca cagagcctgt ccatcacatg caccgtctca	1620
55	gggtttctcat taaccggcta tgggtgaaac tgggttcgcc agcctccagg aaagggtctg	1680
	gagtggtctg gaatgatatg gggatgatga agcacagact ataattcagc tctcaaatcc	1740
60	agactatcga tcaccaagga caactccaag agccaagttt tcttaaaaat gaacagtctg	1800
	caaactgatg acacagccag atactactgt gctcgagatg gttatagtaa ctttcattac	1860

```

tattgttatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctctgg ggggtggaggc 1920
tctgggtggcg gtggatccgg cggaggtggg tcgggtggcg gcggatctga cattgtgctc 1980
5  acccaatctc cagcttcttt ggctgtgtct ctaggtcaga gagccaccat ctctgcaga 2040
gccagtgaag gtgttgaata ttatgtcaca agtttaatgc agtggtagca acagaaacca 2100
10 ggacagccac ccaaactcct catctctgct gctagcaacg tagaatctgg ggtccctgcc 2160
agggttagtg gcagtggggtc tgggacagac tttagcctca acatccatcc tgtggaggag 2220
gatgatattg caatgtatct ctgtcagcaa agtaggaagg ttccatggac gttcgggtgga 2280
15 ggcaccaagc tggaaatcaa acgttaatct aga 2313

<210> 225
20 <211> 764
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial

    <220>
25 <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
    <223> n2H7sssIgG1-H5-2e12HL (AA)

30 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(20)
    <223> Líder

35 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (21)..(126)
    <223> VL

40 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (127)..(142)
    <223> Ligante

45 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (143)..(264)
    <223> VH

50 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (265)..(279)
    <223> Dobradiça

55 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (497)..(511)
    <223> Ligante de EFD-BD2

60 <220>
    <221> misc_característica

```

```

<222> (512)..(632)
<223> VH2

<220>
5 <221> misc_característica
  <222> (633)..(652)
  <223> Ligante2

<220>
10 <221> misc_característica
   <222> (653)..(764)
   <223> VL2

<400> 225
15
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1          5          10          15

20 Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
      20          25          30

25 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
      35          40          45

30 Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
      50          55          60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65          70          75          80

35 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
      85          90          95

40 Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
      100          105          110

45 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
      115          120          125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
130          135          140

50 Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
145          150          155          160

55 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
      165          170          175

60 His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
      180          185          190

```

5 Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
 195 200 205

 10 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 210 215 220

 15 Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 225 230 235 240

 20 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
 245 250 255

 25 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 260 265 270

 30 His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 275 280 285

 35 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 290 295 300

 40 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 305 310 315 320

 45 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 325 330 335

 50 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 340 345 350

 55 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 355 360 365

 60 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 370 375 380

 65 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 385 390 395 400

 70 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415

 75 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 435 440 445

5 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 450 455 460

10 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480

15 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490 495

20 Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln
 500 505 510

Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
 515 520 525

25 Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly
 530 535 540

30 Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
 545 550 555 560

35 Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 565 570 575

40 Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
 580 585 590

45 Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg
 595 600 605

50 Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 610 615 620

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu
 645 650 655

55 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
 660 665 670

60 Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu
 675 680 685

5 Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 690 695 700

10 Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 705 710 715 720

15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu
 725 730 735

20 Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp
 740 745 750

25 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 755 760

<210> 226
 <211> 2322
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

30 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

35 <220>
 <223> n2H7sssIgG1-H6-2e12HL (DNA)

40 <400> 226
 aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tctgtctact ctggctccca 60
 gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tctgtctgc atctccaggg 120
 gagaaggcca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180
 45 cagaagccag gatcctcccc caaacctggg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240
 gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300
 50 gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccaccacg 360
 ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcgggtg gctcgggcgg tggaggatct 420
 ggaggagggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480
 55 ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540
 cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600
 aatggtgata cttcctacaa tcagaagttc aagggaagg ccacactgac tgtagacaaa 660
 tctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720
 60 ttctgtgcaa gagtgggtga ctatagtaac tcttactggg acttcgatgt ctggggcaca 780
 gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca 840

ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 900
 5 aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 960
 cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020
 aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc 1080
 10 gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc 1140
 ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200
 15 gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260
 ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320
 gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380
 20 agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500
 25 ggtggcggtg gctcgggcgg tgggtgatct gggggaggag gcagcgggaa ttctcaggtg 1560
 cagctgaagg agtcaggacc tggcctgggt gcgccctcac agagcctgtc catcacatgc 1620
 accgtctcag ggttctcatt aaccggctat ggtgtaaact gggttcgcca gcctccagga 1680
 30 aagggctctg agtggctggg aatgatatgg ggtgatggaa gcacagacta taattcagct 1740
 ctcaaatcca gactatcgat caccaaggac aactccaaga gccagtttt cttaaaaatg 1800
 35 aacagtctgc aaactgatga cacagccaga tactactgtg ctcgagatgg ttatagtaac 1860
 ttctattact atgttatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctctggg 1920
 ggtggaggct ctggtggcgg tggatccggc ggaggtgggt cgggtggcgg cggatctgac 1980
 40 attgtgtctc cccaatctcc agcttctttg gctgtgtctc taggtcagag agccaccatc 2040
 tcctgcagag ccagtgaag tgttgaatat tatgtcacia gttaaatgca gtggtaccaa 2100
 45 cagaaaccag gacagccacc caaactctc atctctgtg ctagcaacgt agaactctggg 2160
 gtccctgcca ggtttagtgg cagtgggtct gggacagact ttagcctcaa catccatcct 2220
 gtggaggagg atgatattgc aatgtatttc tgtcagcaaa gtaggaaggt tccatggacg 2280
 50 ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa cgttaatcta ga 2322

<210> 227
 <211> 767
 55 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético
 60 <220>

```

    <223> n2H7sssIgG1-H6-2e12HL (AA)

    <220>
    <221> misc_característica
    5 <222> (1)..(20)
    <223> Líder

    <220>
    <221> misc_característica
    10 <222> (21)..(126)
    <223> VL

    <220>
    <221> misc_característica
    15 <222> (127)..(142)
    <223> Ligante

    <220>
    <221> misc_característica
    20 <222> (143)..(264)
    <223> VH

    <220>
    <221> misc_característica
    25 <222> (265)..(279)
    <223> Dobradiça

    <220>
    <221> misc_característica
    30 <222> (497)..(514)
    <223> Ligante de EFD-BD2

    <220>
    <221> misc_característica
    35 <222> (515)..(635)
    <223> VH2

    <220>
    <221> misc_característica
    40 <222> (636)..(655)
    <223> Ligante2

    <220>
    <221> misc_característica
    45 <222> (656)..(767)
    <223> VL2

    <400> 227

50 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
   1             5             10             15

    Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
55             20             25             30

    Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
        35             40             45
60

```


Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 50 55 60

5 Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 65 70 75 80

10 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95

15 Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
 100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
 115 120 125

20 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
 130 135 140

25 Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
 145 150 155 160

30 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
 165 170 175

35 His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
 180 185 190

40 Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
 195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 210 215 220

45 Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 225 230 235 240

50 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
 245 250 255

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 260 265 270

55 His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 275 280 285

60 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 290 295 300

5 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 305 310 315 320
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 325 330 335
 10 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 340 345 350
 15 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 355 360 365
 20 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 370 375 380
 25 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 385 390 395 400
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415
 30 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430
 35 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 435 440 445
 40 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 450 455 460
 45 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490 495
 50 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510
 55 Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro
 515 520 525
 60 Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 530 535 540

Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 545 550 555 560

5 Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala
 565 570 575

10 Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
 580 585 590

15 Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr
 595 600 605

20 Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr
 610 615 620

25 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 625 630 635 640

30 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 645 650 655

35 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
 660 665 670

40 Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val
 675 680 685

45 Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 690 695 700

50 Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
 705 710 715 720

55 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro
 725 730 735

60 Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys
 740 745 750

Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 755 760 765

<210> 228
 <211> 2337
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>

<223> Polinucleotideo sintético

<220>

<223> 2H7sssIgG1-H7-G281 HL (DNA)

5

<400> 228

aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcttgctaata cagtgcctca 60

10

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctccccaaaa ccttgattt atgccccatc caacctggct 240

15

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggtgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

20

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcgggtgg 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtga gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

25

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

30

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttgtga caaaactcac 840

35

acatccccac cgtgctcagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggg 960

40

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggg acgtggacgg cgtggagggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc 1080

gtcctcaccg tcttgacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

45

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

50

ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

55

tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacagc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaaga attatgggtg cgggtggctc ggcgggtggg gatctggagg aggtgggagt 1560

60

gggaattctc aggtgcagct gaaggagtca ggacctggcc tgggtggcgc ctcacagagc 1620

ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc tcattaaccg gctatgggtg aaactgggtt 1680

```

cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg ctgggaatga tatggggtga tggaagcaca 1740
gactataatt cagctctcaa atccagacta tcgatcacca aggacaactc caagagccaa 1800
5 gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccagatacta ctgtgctcga 1860
gatggttata gtaactttca ttactatgtt atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 1920
10 accgtctcct ctgggggtgg aggcctctgtt ggcgggtggat ccggcggagg tgggtcgggt 1980
ggcggcggat ctgacattgt gtcacccaa tctccagctt ctttggtgtg gtctctaggt 2040
cagagagcca ccatctcctg cagagccagt gaaagtgttg aatattatgt cacaagttta 2100
15 atgcagtggg accaacagaa accaggacag ccacccaaac tcctcatctc tgctgctagc 2160
aacgtagaat ctgggggtccc tgccaggttt agtggcagtg ggtctgggac agacttttagc 2220
20 ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg 2280
aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaacgtta atctaga 2337

```

```

25 <210> 229
    <211> 772
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial
30 <220>
    <223> Polipeptídeo sintético

    <220>
    <223> 2H7cscIgG1-STD1-2e12HL (w/2E12 Líder) (AA)
35 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (1)..(22)
    <223> Líder
40 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (23)..(128)
    <223> VL
45 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (129)..(144)
    <223> Ligante
50 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (145)..(265)
    <223> VH
55 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (268)..(282)
    <223> Dobradiça
60 <220>

```

```

<221> misc_característica
<222> (500)..(519)
<223> Ligante de EFD-BD2

5  <220>
    <221> misc_característica
    <222> (520)..(640)
    <223> VH2

10 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (641)..(660)
    <223> Ligante2

15 <220>
    <221> misc_característica
    <222> (661)..(772)
    <223> VL2

20 <400> 229

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10          15

25 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
    20          25          30

30 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
    35          40          45

35 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
    50          55          60

40 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
    65          70          75          80

45 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
    85          90          95

50 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
    100         105         110

55 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
    115         120         125

60 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
    130         135         140

    Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
    145         150         155         160

```

	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	165	170	175
5	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile	180	185	190
10	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	195	200	205
15	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	210	215	220
20	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	225	230	235
25	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp	245	250	255
30	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Cys	260	265	270
35	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly	275	280	285
40	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	290	295	300
45	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	305	310	315
50	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	325	330	335
55	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	340	345	350
60	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	355	360	365
	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	370	375	380
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	385	390	395
	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	405	410	415

5 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445

10 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460

15 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480

20 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495

25 Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro
 515 520 525

30 Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
 530 535 540

35 Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro
 545 550 555 560

40 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
 565 570 575

45 Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn
 580 585 590

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
 595 600 605

50 Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr
 610 615 620

55 Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 625 630 635 640

60 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 645 650 655

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 660 665 670

5 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 675 680 685

10 Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 690 695 700

15 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
 705 710 715 720

20 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
 725 730 735

25 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
 740 745 750

30 Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 755 760 765

35 Glu Ile Lys Arg
 770

<210> 230
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

40 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

45 <220>
 <223> scs(s) -hIgG1 (DNA)

<400> 230
 gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccga gctca 45

50 <210> 231
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

55 <220>
 <223> Polipeptídeo sintético

<220>
 <223> scs(s) -hIgG1 (AA)

60 <400> 231
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser

	1	5	10	15
5	<210> 232 <211> 45 <212> DNA <213> Sequência artificial			
10	<220> <223> Polinucleotídeo sintético			
	<220> <223> ccc(s) (DNA)			
15	<400> 232 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tctccaccgt gctca			45
20	<210> 233 <211> 15 <212> PRT <213> Sequência artificial			
25	<220> <223> Polipeptídeo sintético			
	<220> <223> ccc(s) (AA)			
30	<400> 233 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Ser 1 5 10 15			
35	<210> 234 <211> 24 <212> DNA <213> Sequência artificial			
40	<220> <223> Polinucleotídeo sintético			
45	<220> <223> Ligante H8 (PN)			
	<400> 234 gggtctccac cttctccgaa ttct			24
50	<210> 235 <211> 8 <212> PRT <213> Sequência artificial			
	<220> <223> Peptídeo sintético			
60	<400> 235			

Gly Ser Pro Pro Ser Pro Asn Ser
 1 5

5 <210> 236
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

10 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

15 <220>
 <223> Ligante H9 (PN)
 <400> 236
 tctccacctt ctccgaattc t 21

20 <210> 237
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

25 <220>
 <223> Peptídeo sintético

30 <220>
 <223> Ligante H9 (AA)
 <400> 237

35 Ser Pro Pro Ser Pro Asn Ser
 1 5

40 <210> 238
 <400> 238
 000

45 <210> 239
 <400> 239
 000

50 <210> 240
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

55 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 <220>
 <223> Ligante H11 (PN)

60 <400> 240
 gagccacat ctaccgacaa aactcacaca tctccaccca gcccgattc t 51

```

5      <210> 241
      <211> 17
      <212> PRT
      <213> Sequência artificial

      <220>
      <223> Polinucleotídeo sintético

10     <220>
      <223> Ligante H11 (AA)

      <400> 241

15     Glu Pro Thr Ser Thr Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Asn
      1          5          10          15

20     Ser

      <210> 242
      <211> 51
      <212> DNA
      <213> Sequência artificial

      <220>
      <223> Polinucleotídeo sintético

30     <220>
      <223> Ligante H12 (PN)

      <400> 242

35     gagccacat ctaccgacaa aactcacaca tctccaccca gcccgattc t
      1          5          10          15          20          25          30          35          40          45          50          55          60          65          70          75          80          85          90          95          100          105          110          115          120          125          130          135          140          145          150          155          160          165          170          175          180          185          190          195          200          205          210          215          220          225          230          235          240          245          250          255          260          265          270          275          280          285          290          295          300          305          310          315          320          325          330          335          340          345          350          355          360          365          370          375          380          385          390          395          400          405          410          415          420          425          430          435          440          445          450          455          460          465          470          475          480          485          490          495          500          505          510          515          520          525          530          535          540          545          550          555          560          565          570          575          580          585          590          595          600          605          610          615          620          625          630          635          640          645          650          655          660          665          670          675          680          685          690          695          700          705          710          715          720          725          730          735          740          745          750          755          760          765          770          775          780          785          790          795          800          805          810          815          820          825          830          835          840          845          850          855          860          865          870          875          880          885          890          895          900          905          910          915          920          925          930          935          940          945          950          955          960          965          970          975          980          985          990          995          1000

51     gagccacat ctaccgacaa aactcacaca tctccaccca gcccgattc t
      1          5          10          15          20          25          30          35          40          45          50          55          60          65          70          75          80          85          90          95          100          105          110          115          120          125          130          135          140          145          150          155          160          165          170          175          180          185          190          195          200          205          210          215          220          225          230          235          240          245          250          255          260          265          270          275          280          285          290          295          300          305          310          315          320          325          330          335          340          345          350          355          360          365          370          375          380          385          390          395          400          405          410          415          420          425          430          435          440          445          450          455          460          465          470          475          480          485          490          495          500          505          510          515          520          525          530          535          540          545          550          555          560          565          570          575          580          585          590          595          600          605          610          615          620          625          630          635          640          645          650          655          660          665          670          675          680          685          690          695          700          705          710          715          720          725          730          735          740          745          750          755          760          765          770          775          780          785          790          795          800          805          810          815          820          825          830          835          840          845          850          855          860          865          870          875          880          885          890          895          900          905          910          915          920          925          930          935          940          945          950          955          960          965          970          975          980          985          990          995          1000

40     <210> 243
      <211> 17
      <212> PRT
      <213> Sequência artificial

      <220>
      <223> Peptídeo sintético

45     <220>
      <223> Ligante H12 (AA)

      <400> 243

50     Glu Pro Thr Ser Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Asn
      1          5          10          15          20          25          30          35          40          45          50          55          60          65          70          75          80          85          90          95          100          105          110          115          120          125          130          135          140          145          150          155          160          165          170          175          180          185          190          195          200          205          210          215          220          225          230          235          240          245          250          255          260          265          270          275          280          285          290          295          300          305          310          315          320          325          330          335          340          345          350          355          360          365          370          375          380          385          390          395          400          405          410          415          420          425          430          435          440          445          450          455          460          465          470          475          480          485          490          495          500          505          510          515          520          525          530          535          540          545          550          555          560          565          570          575          580          585          590          595          600          605          610          615          620          625          630          635          640          645          650          655          660          665          670          675          680          685          690          695          700          705          710          715          720          725          730          735          740          745          750          755          760          765          770          775          780          785          790          795          800          805          810          815          820          825          830          835          840          845          850          855          860          865          870          875          880          885          890          895          900          905          910          915          920          925          930          935          940          945          950          955          960          965          970          975          980          985          990          995          1000

55     Ser

      <210> 244
      <211> 51
      <212> DNA
      <213> Sequência artificial

60     <210> 245
      <211> 51
      <212> DNA
      <213> Sequência artificial

```

<220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

5 <220>
 <223> Ligante H13 (PN)

<400> 244
 gagccacat ctaccgacaa aactcacaca tctccacca gcccgattc t 51

10 <210> 245
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

15 <220>
 <223> Peptídeo sintético

20 <220>
 <223> Ligante H13 (AA)

<400> 245
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Asn
 25 1 5 10 15

Ser

30 <210> 246
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

35 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

40 <220>
 <223> Ligante H15 (PN)

<400> 246
 ggcgggtggtg gctcctgtcc accttgctcg aattct 36

45 <210> 247
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

50 <220>
 <223> Peptídeo sintético

55 <220>
 <223> Ligante H15 (AA)

<400> 247
 Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser
 60 1 5 10

<210> 248
 <211> 45
 <212> DNA
 5 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

 10 <220>
 <223> Ligante H16 (PN)

 <400> 248
 15 ctgtctgtga aagctgactt cctcactcca tccatcgga attct 45

 <210> 249
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 25 <220>
 <223> Ligante H16 (AA)

 <400> 249
 30 Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Leu Thr Pro Ser Ile Gly Asn Ser
 1 5 10 15

 35 <210> 250
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 40 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

 <220>
 45 <223> Ligante H17 (PN)

 <400> 250
 ctgtctgtga aagctgactt cctcactcca tccatctcct gtccaccttg cccgaattct 60

 50 <210> 251
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 55 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 60 <220>
 <223> Ligante H17 (AA)

<400> 251

5 Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Leu Thr Pro Ser Ile Ser Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Asn Ser
20

10

<210> 252
<211> 45
<212> DNA
15 <213> Sequência artificial

<220>
<223> Polinucleotídeo sintético

20

<220>
<223> Ligante H18 (PN)

<400> 252
25 ctgtctgtgc tcgctaactt cagtcagcca gagatcgggg attct 45

<210> 253
<211> 15
30 <212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Peptídeo sintético

35

<220>
<223> Ligante H18 (AA)

40 <400> 253

Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Gly Asn Ser
1 5 10 15

45

<210> 254
<211> 60
<212> DNA
50 <213> Sequência artificial

<220>
<223> Polinucleotídeo sintético

55 <220>
<223> Ligante H19 (PN)

<400> 254
60 ctgtctgtgc tcgctaactt cagtcagcca gagatctcct gtccacccttg cccgaattct 60

<210> 255
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5
 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 10 <220>
 <223> Ligante H19 (AA)

 <400> 255

 15 Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Ser Cys Pro Pro
 1 5 10 15

 Cys Pro Asn Ser
 20 20

 <210> 256
 <211> 45
 25 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 30

 <220>
 <223> Ligante H20 (PN)

 35 <400> 256
 ctgaaaatcc aggagagggt cagtaagcca aagatctcga attct 45

 <210> 257
 40 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 45 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 <223> Ligante H20 (AA)
 50
 <400> 257

 Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Asn Ser
 1 5 10 15
 55

 <210> 258
 <211> 60
 <212> DNA
 60 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Polipeptídeo sintético

5 <220>
 <223> Ligante H21 (PN)

<400> 258
 ctgaaaatcc aggagagggg cagtaagcca aagatctcct gtccaccttg cccgaattct 60

10

<210> 259
 <211> 20
 <212> PRT
 15 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Peptídeo sintético

20 <220>
 <223> Ligante H21 (AA)

<400> 259

25 Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Cys Pro Pro
 1 5 10 15

30 Cys Pro Asn Ser
 20

<210> 260
 <211> 45
 35 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Polipeptídeo sintético

40 <220>
 <223> Ligante H22 (PN)

<400> 260
 45 ctggatgtga gtgagaggcc ttttcctcca cacatccaga attct 45

<210> 261
 <211> 15
 50 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Peptídeo sintético

55

<220>
 <223> Ligante H22 (AA)

60 <400> 261

Leu Asp Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Asn Ser
 1 5 10 15

5 <210> 262
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

10 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

15 <220>
 <223> Ligante H23 (PN)

<400> 262
 ctggatgtga gtgagaggcc ttttctcca cacatccagt cctgtccacc ttgccggaat 60

20 tct 63

25 <210> 263
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

30 <220>
 <223> Peptídeo sintético

35 <220>
 <223> Ligante H23 (AA)

<400> 263

Leu Asp Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Ser Cys Pro
 1 5 10 15

40 Pro Cys Pro Asn Ser
 20

45 <210> 264
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

50 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

<220>
 <223> Ligante H24 (DNA)

55 <400> 264
 cgggaacagc tggcagaggt cactttgagc ttgaaagcga attct 45

60 <210> 265
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 5
 <220>
 <223> Ligante H24 (AA)
 <400> 265
 10
 Arg Glu Gln Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Leu Lys Ala Asn Ser
 1 5 10 15
 <210> 266
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 15
 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 20
 <220>
 <223> Ligante H25 (PN)
 <400> 266
 cgggaacagc tggcagaggt cactttgagc gtgaaagctt gtccaccctg cccgaattct 60
 30
 <210> 267
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 35
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 40
 <220>
 <223> Ligante H25 (AA)
 <400> 267
 45
 Arg Glu Gln Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Leu Lys Ala Cys Pro Pro
 1 5 10 15
 Cys Pro Asn Ser
 50 20
 <210> 268
 <211> 45
 55
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético
 60

```

<220>
<223>  Ligante H26 (PN)

<400>  268
5  cggattcacc agatgaactc cgagttgagc gtgctcgcca attct 45

<210>  269
<211>  15
10 <212>  PRT
    <213>  Sequência artificial

<220>
<223>  Peptídeo sintético
15

<220>
<223>  Ligante H26 (AA)

20 <400>  269

    Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Ser
    1             5             10             15

25
    <210>  270
    <211>  60
    <212>  DNA
    <213>  Sequência artificial
30

    <220>
    <223>  Polinucleotídeo sintético

35 <220>
    <223>  Ligante H27 (PN)

<400>  270
40 cggattcacc agatgaactc cgagttgagc gtgctcgctt gtccaccctg cccgaattct 60

    <210>  271
    <211>  20
    <212>  PRT
45 <213>  Sequência artificial

    <220>
    <223>  Peptídeo sintético

50 <220>
    <223>  Ligante H27 (AA)

<400>  271

55 Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Cys Pro Pro
    1             5             10             15

    Cys Pro Asn Ser
60             20

```

<210> 272
 <211> 45
 <212> DNA
 5 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

 10
 <220>
 <223> Ligante H28 (PN)

 <400> 272
 15 gataccaaag ggaagaacgt cctcgagaag atcttctcga attct 45

 <210> 273
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 25

 <220>
 <223> Ligante H28 (AA)

 30 <400> 273

 Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Ser Asn Ser
 1 5 10 15

 35
 <210> 274
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 40
 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

 45 <220>
 <223> Ligante H29 (PN)

 <400> 274
 50 gataccaaag ggaagaacgt cctcgagaag atcttcgact cctgtocacc ttgcccgaaat 60
 tct 63

 <210> 275
 55 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 60 <223> Peptídeo sintético

<220>
 <223> Ligante H29 (AA)

5 <400> 275

Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Ser Cys Pro
 1 5 10 15

10 Pro Cys Pro Asn Ser
 20

15 <210> 276
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

20 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

25 <220>
 <223> Ligante H30 (PN)

<400> 276
 ctgccacctg agacacagga gagtcaagaa gtcaccctga attct 45

30 <210> 277
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

35 <220>
 <223> Peptídeo sintético

40 <220>
 <223> Ligante H30 (AA)

<400> 277

45 Leu Pro Pro Glu Thr Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Asn Ser
 1 5 10 15

50 <210> 278
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

55 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

60 <220>
 <223> Ligante H31 (PN)

<400> 278

ctgccacctg agacacagga gagtcaagaa gtcacctgt cctgtccacc ttgcccgaat 60
tct 63

5
<210> 279
<211> 21
<212> PRT
<213> Sequência artificial

10
<220>
<223> Peptídeo sintético

15
<220>
<223> Ligante H31 (AA)
<400> 279

20 Leu Pro Pro Glu Thr Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Ser Cys Pro
1 5 10 15

25 Pro Cys Pro Asn Ser
20

30
<210> 280
<211> 45
<212> DNA
<213> Sequência artificial

35
<220>
<223> Polinucleotídeo sintético

40
<220>
<223> Ligante H32 (PN)

40 <400> 280
cggattcacc tgaacgtgtc cgagaggccc ttctctccga attct 45

45
<210> 281
<211> 15
<212> PRT
<213> Sequência artificial

50
<220>
<223> Peptídeo sintético

55
<220>
<223> Ligante H32 (AA)
<400> 281

60 Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Asn Ser
1 5 10 15

<210> 282
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 5
 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

 10 <220>
 <223> Ligante H33 (PN)

 <400> 282
 15 cggatttcacc tgaacgtgtc cgagaggccc ttctctccct gtccaccctg cccgaattct 60

 <210> 283
 <211> 20
 <212> PRT
 20 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 25
 <220>
 <223> Ligante H33 (AA)

 <400> 283
 30 Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Cys Pro Pro
 1 5 10 15

 35 Cys Pro Asn Ser
 20

 <210> 284
 40
 <400> 284
 000

 <210> 285
 45
 <400> 285
 000

 <210> 286
 50
 <400> 286
 000

 <210> 287
 55
 <400> 287
 000

 <210> 288
 60 <211> 39
 <212> DNA

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 5
 <220>
 <223> Ligante H36 (PN)
 10 <400> 288
 ggggtgtccac cttgtccagg cgggtggtgga tcgaattct 39
 <210> 289
 15 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 20 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 <223> Ligante H36 (AA)
 25 <400> 289
 Gly Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser
 1 5 10
 30
 <210> 290
 <400> 290
 35 000
 <210> 291
 <400> 291
 40 000
 <210> 292
 <400> 292
 45 000
 <210> 293
 <400> 293
 50 000
 <210> 294
 <400> 294
 55 000
 <210> 295
 <400> 295
 60 000

<210> 296
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 5
 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

 10 <220>
 <223> Ligante H40 (PN)

 <400> 296
 ggatgtccac cttgtcccg c gaattct 27
 15

 <210> 297
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 25
 <220>
 <223> Ligante H40 (AA)

 <400> 297
 30
 Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Asn Ser
 1 5

 35 <210> 298

 <400> 298
 000

 40 <210> 299
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 45 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 50 <221> misc_característica
 <223> Ligante H41

 <400> 299

 55 Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Asn Ser
 1 5

 <210> 300
 60
 <400> 300

```

000
<210> 301
<211> 8
5 <212> PRT
   <213> Sequência artificial

<220>
<223> Peptídeo sintético
10
<220>
<223> Ligante H42 (AA)

<400> 301
15 Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser
   1             5

20 <210> 302

   <400> 302
   000

25 <210> 303

   <400> 303
   000

30 <210> 304
   <211> 36
   <212> DNA
   <213> Sequência artificial

35 <220>
   <223> Polinucleotídeo sintético

<220>
40 <223> Ligante H44 (PN)

   <400> 304
   ggaggagcta gttgtccacc ttgtcccgga aattct
                                           36

45
<210> 305
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial
50
<220>
<223> Peptídeo sintético

55 <220>
   <223> Ligante H44 (AA)

<400> 305

60 Gly Gly Ala Ser Cys Pro Pro Cys Pro Gly Asn Ser
   1             5             10

```

5 <210> 306
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 10 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

 <220>
 <223> Ligante H45 (PN)

 15 <400> 306
 ggaggagcca gttgtccacc ttgtgccggg aattct 36

 20 <210> 307
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 25 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 <223> Ligante H45 (AA)
 30 <400> 307

 Gly Gly Ala Ser Cys Pro Pro Cys Ala Gly Asn Ser
 1 5 10
 35 <210> 308
 <211> 33
 <212> DNA
 40 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

 45 <220>
 <223> Ligante H46

 <400> 308
 ggaggagcca gttgtccacc ttgtgcgaat tct 33
 50 <210> 309
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 55 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 60 <223> Ligante H46

<400> 309
 Gly Gly Ala Ser Cys Pro Pro Cys Ala Asn Ser
 1 5 10

5 <210> 310
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

10 <220>
 <223> Peptídeo sintético

<220>
 <223> Ligante H47

15 <400> 310
 Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Leu Thr Pro Ser Ile Gly Asn Ser
 1 5 10 15

20 <210> 311
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Peptídeo sintético

30 <220>
 <223> Ligante H48

<400> 311

35 Lys Ala Asp Phe Leu Thr Pro Ser Ile Gly Asn Ser
 1 5 10

40 <210> 312
 <400> 312
 000

45 <210> 313
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 50 <223> Peptídeo sintético

<220>
 <223> Ligante H50

55 <400> 313
 Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Gly Asn Ser
 1 5 10 15

60 <210> 314

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 10 <220>
 <223> Ligante H51
 <400> 314
 Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Gly Asn Ser
 15 1 5 10 15
 <210> 315
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 25 <220>
 <223> Ligante H52
 <400> 315
 30 Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ser
 1 5 10
 35 <210> 316
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 40 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 45 <223> Ligante H53
 <400> 316
 Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser
 50 1 5 10 15
 <210> 317
 <211> 19
 55 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 60

<220>
 <223> Ligante H54
 <400> 317
 5 Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Ser Cys Pro Pro Cys
 1 5 10 15
 10 Pro Asn Ser
 <210> 318
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 20 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 <223> Ligante H55
 25 <400> 318
 Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Ser
 1 5 10 15
 30 <210> 319
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 40 <220>
 <223> Ligante H56
 <400> 319
 45 Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Ser
 1 5 10
 <210> 320
 50 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 55 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 <223> Ligante H57
 60 <400> 320

	Val	Ser	Glu	Arg	Pro	Phe	Pro	Pro	Asn	Ser					
	1				5					10					
5															
	<210>	321													
	<211>	15													
	<212>	PRT													
	<213>	Sequência artificial													
10															
	<220>														
	<223>	Peptídeo sintético													
15															
	<220>														
	<223>	Ligante H58													
	<400>	321													
20	Lys	Pro	Phe	Phe	Thr	Cys	Gly	Ser	Ala	Asp	Thr	Cys	Pro	Asn	Ser
	1				5					10				15	
25															
	<210>	322													
	<211>	15													
	<212>	PRT													
	<213>	Sequência artificial													
30															
	<220>														
	<223>	Peptídeo sintético													
35															
	<220>														
	<223>	Ligante H59													
	<400>	322													
40	Lys	Pro	Phe	Phe	Thr	Cys	Gly	Ser	Ala	Asp	Thr	Cys	Pro	Asn	Ser
	1				5					10				15	
45															
	<210>	323													
	<211>	14													
	<212>	PRT													
	<213>	Sequência artificial													
50															
	<220>														
	<223>	Peptídeo sintético													
	<220>														
	<223>	Ligante H60													
55															
	<400>	323													
60	Gln	Tyr	Asn	Cys	Pro	Gly	Gln	Tyr	Thr	Phe	Ser	Met	Asn	Ser	
	1				5					10					
	<210>	324													
	<211>	21													
	<212>	PRT													
	<213>	Sequência artificial													

<220>
 <223> Peptídeo sintético

5 <220>
 <223> Ligante H61
 <400> 324

10 Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser
 1 5 10 15

15 Asp Cys Pro Asn Ser
 20

<210> 325
 <211> 21
 20 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Peptídeo sintético

25

<220>
 <223> Ligante H62

30 <400> 325

Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys Ala Arg
 1 5 10 15

35 His Cys Pro Asn Ser
 20

40 <210> 326
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

45 <220>
 <223> Peptídeo sintético

<220>
 50 <223> Ligante H63
 <400> 326

Asn Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr
 55 1 5 10 15

Cys Asn Ser

60

<210> 327
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 <400> 327
 10
 Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys Ala Arg
 1 5 10 15
 15 His Cys Pro Asn Ser
 20
 <210> 328
 20 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 25 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 <223> Ligante H65
 30
 <400> 328
 Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser
 1 5 10 15
 35 Asp Cys Pro Asn Ser
 20
 40
 <210> 329
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 45
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 50 <223> Ligante H66
 <400> 329
 Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser
 55 1 5 10 15
 Asp Cys Pro Asn Ser
 20
 60

<210> 330
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 10
 <220>
 <223> Ligante H67
 <400> 330
 15 Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser
 1 5 10 15
 Asp Cys Pro Asn Ser
 20 20
 <210> 331
 <211> 118
 25 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 30
 <220>
 <223> Ligante H68
 <400> 331
 35 Arg Thr Arg Tyr Leu Gln Val Ser Gln Gln Leu Gln Gln Thr Asn Arg
 1 5 10 15
 Val Leu Glu Val Thr Asn Ser Ser Leu Arg Gln Gln Leu Arg Leu Lys
 40 20 25 30
 Ile Thr Gln Leu Gly Gln Ser Ala Glu Asp Leu Gln Gly Ser Arg Arg
 45 35 40 45
 Glu Leu Ala Gln Ala Gln Glu Ala Leu Gln Val Glu Gln Arg Ala His
 50 50 55 60
 Gln Ala Ala Glu Gly Gln Leu Gln Ala Cys Gln Ala Asp Arg Gln Lys
 65 70 75 80
 55 Thr Lys Glu Thr Leu Gln Ser Glu Glu Gln Gln Arg Arg Ala Leu Glu
 85 90 95
 60 Gln Lys Leu Ser Asn Met Glu Asn Arg Leu Lys Pro Phe Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Ser Ala Asp Thr Cys
 115
 5
 <210> 332
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 15
 <220>
 <223> anti-CD-20 VL CDR1
 <400> 332
 20 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
 1 5 10
 25 <210> 333
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 30 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 35 <223> anti-CD-20 VL CDR1
 <400> 333
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile Val
 40 1 5 10
 <210> 334
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 50
 <220>
 <223> anti-CD-20 VL CDR3
 55 <400> 334
 Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 1 5
 60
 <210> 335

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 10 <223> anti-CD-20 VL CDR3
 <400> 335
 Gln Gln Tyr Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 15 1 5
 <210> 336
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 25
 <220>
 <223> anti-CD-20 VH CDR2
 30 <400> 336
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 35 Gly
 40 <210> 337
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 45 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 50 <223> anti-CD-20 VH CDR2
 <400> 337
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Glu Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 55 1 5 10 15
 Gly
 60

<210> 338
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5
 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 10 <220>
 <223> anti-CD20 VH CDR3

 <400> 338

 15 Ser Val Tyr Tyr Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

 20 <210> 339
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 25 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 <223> anti-CD20 VH CDR3
 30
 <400> 339

 Ser Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 35

 <210> 340
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 45
 <220>
 <223> anti-CD20 VH CDR3

 <400> 340
 50
 Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

 55 <210> 341
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 60 <220>
 <223> Peptídeo sintético

<220>
 <223> anti-CD20 VH CDR3
 5 <400> 341

 Ser Tyr Tyr Ser Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 10

 <210> 342
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 20

 <220>
 <223> anti-CD20 VH CDR3

 <400> 342
 25
 Ser Tyr Lys Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

 30 <210> 343
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 35 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 40 <223> anti-CD20 VH CDR3

 <400> 343

 Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
 45 1 5 10

 <210> 344
 <211> 12
 50 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 55

 <220>
 <223> anti-CD-20 VH CDR3

 60 <400> 344

Ser Tyr Lys Ser Asn Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

5 <210> 345
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

10 <220>
 <223> Peptídeo sintético

<220>
 15 <223> anti-CD20 VH CDR3
 <400> 345

Ser Tyr Lys Ser Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 20 1 5 10

<210> 346
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Peptídeo sintético
 30

<220>
 <223> Sequência (2H7) de núcleo de ligante *Scorpion*

35 <400> 346

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser
 1 5

40 <210> 347
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

45 <220>
 <223> Peptídeo sintético

50 <220>
 <223> Sequência de Extensão
 <400> 347

55 Ala Pro Glu Leu
 1

<210> 348
 60 <211> 9
 <212> PRT

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 5
 <220>
 <223> Sequência de Extensão
 10 <400> 348
 Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 15
 <210> 349
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 20
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 25
 <220>
 <223> Sequência de Extensão
 <400> 349
 30 Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 35
 <210> 350
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 40 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 <223> Sequência de Extensão
 45
 <400> 350
 Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 50
 Gly Gly Ser
 55
 <210> 351
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 60
 <220>

<223> Peptídeo sintético
 <220>
 5 <223> Ligante *Scorpion* Estendido
 <400> 351
 Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Ala Pro Glu Leu
 10 1 5 10
 <210> 352
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Ligante *Scorpion* Estendido
 20 <400> 352
 Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly
 25 1 5 10 15
 Ser
 30
 <210> 353
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 35 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 40 <220>
 <223> Ligante *Scorpion* Estendido
 <400> 353
 45 Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 50 20
 <210> 354
 <211> 27
 55 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 60

<220>
 <223> Ligante *Scorpion* Estendido

 <400> 354
 5 Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

 10 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

 <210> 355
 15 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 20 <223> Peptídeo sintético

 <220>
 <223> VL CDR1-X-VL CDR3-X- VH CDR2-X-VH CDR3
 25
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3
 30
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2
 35
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3
 40
 <400> 355

 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
 1 5 10 15
 45
 Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 20 25 30

 50 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Val Tyr Tyr Ser Asn Tyr Trp Tyr
 35 40 45

 55 Phe Asp Leu
 50

 <210> 356
 60 <211> 51
 <212> PRT

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 5
 <220>
 <223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3
 10 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3
 15 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2
 20 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3
 25 <400> 356
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
 1 5 10 15
 30 Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 20 25 30
 35 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Trp Tyr
 35 40 45
 40 Phe Asp Leu
 50
 <210> 357
 <211> 51
 45 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 50
 <220>
 <223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3
 55 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3
 60 <220>
 <221> misc_característica

```

<222> (21)..(21)
<223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2

<220>
5 <221> misc_característica
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3

<400> 357
10 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
    1              5              10              15

15 Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
    20              25              30

    Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Asp Trp Tyr
20      35              40              45

    Phe Asp Leu
    50
25

<210> 358
<211> 51
<212> PRT
30 <213> Sequência artificial

<220>
<223> Peptídeo sintético

35
<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
40 <221> misc_característica
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3

<220>
45 <221> misc_característica
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2

<220>
50 <221> misc_característica
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3

<400> 358
55 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
    1              5              10              15

60 Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
    20              25              30

```

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Gly Gly Asp Trp Tyr
 35 40 45
 5

Phe Asp Leu
 50

10

<210> 359
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

15

<220>
 <223> Peptídeo sintético

20

<220>
 <223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
 <221> misc_característica

25

<222> (11)..(11)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3

<220>
 <221> misc_característica

30

<222> (21)..(21)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2

<220>
 <221> misc_característica

35

<222> (39)..(39)
 <223> Xaa uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3

<400> 359

40 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile Val Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
 1 5 10 15

45 Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Lys Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr
 35 40 45

50

Phe Asp Leu
 50

55

<210> 360
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

60

<220>

```

    <223> Peptídeo sintético

    <220>
5    <223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (11)..(11)
10   <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (21)..(21)
15   <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (39)..(39)
20   <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3

    <400> 360

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile Val Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
25   1             5             10             15

    Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Glu Thr Ser Tyr
    20             25             30
30

    Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr
    35             40             45
35

    Phe Asp Leu
    50

40   <210> 361
    <211> 51
    <212> PRT
    <213> Sequência artificial

45   <220>
    <223> Peptídeo sintético

    <220>
50   <223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (11)..(11)
55   <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3

    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (21)..(21)
60   <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2

```

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3
 5
 <400> 361
 Arg Ala Ser Ser Val Ser Tyr Ile Val Xaa Gln Gln Tyr Ser Phe
 1 5 10 15
 10
 Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 20 25 30
 15
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr
 35 40 45
 20 Phe Asp Leu
 50
 <210> 362
 25 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 <223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3
 35
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3
 40
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2
 45
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3
 50
 <400> 362
 Arg Ala Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
 1 5 10 15
 55
 Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 20 25 30
 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Lys Ser Asn Ser Asp Trp Tyr

	35	40	45
5	Phe Asp Leu 50		
10	<210> 363 <211> 51 <212> PRT <213> Sequência artificial		
15	<220> <223> Peptídeo sintético		
20	<220> <223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3		
25	<220> <221> misc_característica <222> (11)..(11) <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3		
30	<220> <221> misc_característica <222> (21)..(21) <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2		
35	<220> <221> misc_característica <222> (39)..(39) <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3		
40	<400> 363		
	Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe 1 5 10 15		
45	Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Glu Thr Ser Tyr 20 25 30		
50	Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Asp Trp Tyr 35 40 45		
55	Phe Asp Leu 50		
60	<210> 364 <211> 51 <212> PRT <213> Sequência artificial		
	<220> <223> Peptídeo sintético		

```

    <220>
    <223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

5    <220>
    <221> misc_característica
    <222> (11)..(11)
    <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3

10   <220>
    <221> misc_característica
    <222> (21)..(21)
    <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2

15   <220>
    <221> misc_característica
    <222> (39)..(39)
    <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3

20   <400> 364

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Tyr Ser Phe
1           5           10           15

25   Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
           20           25           30

30   Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Asp Trp Tyr
           35           40           45

35   Phe Asp Leu
           50

    <210> 365
    <211> 51
    <212> PRT
40   <213> Sequência artificial

    <220>
    <223> Peptídeo sintético

45   <220>
    <223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

    <220>
50   <221> misc_característica
    <222> (11)..(11)
    <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR1 e VL CDR3

    <220>
55   <221> misc_característica
    <222> (21)..(21)
    <223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VL CDR3 e VH CDR2

    <220>
60   <221> misc_característica
    <222> (39)..(39)

```

<223> Xaa = uma faixa de aminoácidos entre VH CDR2 e VH CDR3

<400> 365

5 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Tyr Ser Phe
1 5 10 15

10 Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Glu Thr Ser Tyr
20 25 30

15 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Lys Ser Gly Gly Asp Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

20 <210> 366
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

25 <220>
<223> Peptídeo sintético

30 <220>
<223> Sequência de CH3 parcial

<400> 366

35 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1 5 10

40 <210> 367
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

45 <220>
<223> Peptídeo sintético

50 <220>
<223> Sequência de CH3 parcial

<400> 367

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5

55 <210> 368
<211> 1
<212> PRT

60 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Peptídeo sintético

5 <220>
 <223> Sequência de CH3 parcial
 <400> 368

10 Gln
 1

15 <210> 369
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

20 <220>
 <223> Peptídeo sintético

25 <220>
 <223> Sequência de CH3 parcial
 <400> 369
 Gln Lys Ser
 1

30

35 <210> 370
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

40 <220>
 <223> Peptídeo sintético

40 <220>
 <223> Sequência de CH3 parcial
 <400> 370

45 Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 1 5

50 <210> 371
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

55 <220>
 <223> Peptídeo sintético

60 <220>
 <223> Sequência de CH3 parcial

<400> 371
 Gln Lys Ser Leu Ser
 1 5
 5
 <210> 372
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 15
 <220>
 <223> Ligante *Scorpion*
 <400> 372
 20 Gly Cys Pro Pro Cys
 1 5
 25 <210> 373
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 30 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 35 <223> Ligante *Scorpion*
 <400> 373
 Gln Tyr Asn Cys Pro Gly Gln Tyr Thr Phe Ser Met
 40 1 5 10
 <210> 374
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 50
 <220>
 <223> Ligante *Scorpion*
 55 <400> 374
 Pro Phe Phe Thr Cys Gly Ser Ala Asp Thr Cys
 1 5 10
 60
 <210> 375

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 10 <220>
 <223> Ligante *Scorpion*
 <400> 375
 Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser
 15 1 5 10 15
 Asp Cys
 20
 <210> 376
 <211> 18
 <212> PRT
 25 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 30
 <220>
 <223> Ligante *Scorpion*
 <400> 376
 35 Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys Ala Arg
 1 5 10 15
 40 His Cys
 45 <210> 377
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 50 <223> Peptídeo sintético
 <220>
 <223> Ligante *Scorpion*
 55 <400> 377
 Asn Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr
 60 1 5 10 15

Cys

5 <210> 378
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 10 <220>
 <223> Peptídeo sintético

 15 <220>
 <223> anti-CD20 VL CDR1 (TRU-015)

 <400> 378

 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 20 1 5 10

 <210> 379
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Peptídeo sintético
 30

 <220>
 <223> anti-CD20 VH CDR3 (TRU-015)

 35 <400> 379

 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação multivalente de cadeia simples com função efetora caracterizada por compreender:

a. um primeiro domínio de ligação derivado de uma
5 imunoglobulina ou molécula imunoglobulina-like;

b. uma sub-região constante que fornece uma função efetora, a sub-região constante da imunoglobulina localizada no terminal C em relação ao primeiro domínio de ligação;

10 c. um ligante *scorpion* localizado no terminal C em relação à sub-região constante; e

d. um segundo domínio de ligação derivado de uma imunoglobulina ou molécula imunoglobulina-like localizado no terminal C em relação à sub-região constante;

15 localizando, dessa forma a sub-região constante entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação.

2. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de
20 ligação compreende uma região variável leve derivada de uma primeira imunoglobulina e uma região variável pesada derivada de uma segunda imunoglobulina.

3. Proteína, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a primeira imunoglobulina e
25 a segunda imunoglobulina são a mesma imunoglobulina.

4. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação
compreende uma região variável leve derivada de uma primeira imunoglobulina e uma região variável pesada
30 derivada de uma segunda imunoglobulina.

5. Proteína, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a primeira imunoglobulina e a segunda imunoglobulina são a mesma imunoglobulina.

6. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhecem o mesmo alvo molecular.

7. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhecem o mesmo epitopo.

8. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhecem alvos moleculares diferentes na mesma célula eucariótica, célula procariótica, vírus, veículo ou objeto.

9. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhecem alvos moleculares associados às células eucarióticas, células procarióticas, vírus, veículos ou objetos fisicamente distintos.

10. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhece pelo menos um alvo molecular não associado a uma célula eucariótica, célula procariótica, vírus, veículo ou objeto.

11. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de

ligação, o segundo domínio de ligação e a sub-região constante são, cada um, derivados de uma imunoglobulina humana.

12. Proteína, de acordo com a reivindicação, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhece um alvo em uma célula cancerígena.

13. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhece um alvo selecionado do grupo que consiste em um antígeno tumoral, um alvo de célula B, um membro da superfamília do receptor de TNF, um membro da família Hedgehog, uma tirosina quinase receptora, uma molécula relacionada ao proteoglicano, um membro da superfamília TGF-beta, uma molécula relacionada a Wnt, um ligante de receptor, um alvo de célula T, um alvo de célula dendrítica, um alvo de célula NK, um alvo celular de monócito/macrófago e um alvo de angiogênese.

14. Proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o antígeno tumoral é selecionado do grupo que consiste em antígeno 1 do carcinoma de células escamosas, antígeno 2 do carcinoma de células escamosas, antígeno do carcinoma ovariano CA125, mucina 1, antígeno tumoral CTCL se1-1, antígeno tumoral CTCL se14-3, antígeno tumoral CTCL se20-4, antígeno tumoral CTCL se20-9, antígeno tumoral CTCL se33-1, antígeno tumoral CTCL se37-2, antígeno tumoral CTCL se57-1, antígeno tumoral CTCL se89- 1, antígeno da membrana específico da próstata, glicoproteína oncofetal do trofoblasto 5T4, herpesvírus

associado ao sarcoma de Kaposi Orf73, MAGE-C1, MAGE-B1 antígeno, antígeno MAGE-B2, antígeno MAGE-2, antígeno MAGE-4a, antígeno MAGE-4b, antígeno do câncer de cólon NY-CO-45, antígeno do câncer de pulmão NY-LU-12 variante A, antígeno
 5 de superfície associado ao câncer, antígeno do adenocarcinoma ART1, antígeno paraneoplásico associado ao câncer cerebral-testicular, antígeno ventral neuro-oncológico 2, gene do antígeno do carcinoma hepatocelular 520, antígeno tumor-associado CO-029, antígeno MAGE-X2
 10 tumor-associado, sarcoma sinovial X breakpoint 2, antígeno do carcinoma de células escamosas reconhecido por célula T, antígeno do câncer de cólon definido sorologicamente 1, antígeno do câncer de mama definido sorologicamente NY-BR-15, antígeno do câncer de mama definido sorologicamente NY-
 15 BR-16, cromogranina A; proteína secretora da paratireóide 1, DUPAN-2, CA 19-9, CA 72-4, CA 195 e L6.

15. Proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o alvo de célula B é selecionado do grupo que consiste em CD10, CD19, CD20,
 20 CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD38, CD39, CD40, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD78, CD79a/b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD89, CD98, CD126, CD127, CDw130, CD138 e CDw150.

16. Proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o membro da superfamília do
 25 receptor de TNF é selecionado do grupo que consiste em 4-1BB/TNFRSF9, NGF R/TNFRSF16, BAFF R/TNFRSF13C, osteoprotegerina/TNFRSF11B, BCMA/TNFRSF17, OX40/TNFRSF4, CD27/TNFRSF7, RANK/TNFRSF11A, CD30/TNFRSF8, RELT/TNFRSF19L,
 30 CD40/TNFRSF5, TACI/TNFRSF13B, DcR3/TNFRSF6B, TNF

RI/TNFRSF1A, DcTRAIL R1/TNFRSF23, TNF R1/TNFRSF1B, DcTRAIL
 R2/TNFRSF22, TRAIL R1/TNFRSF10A, DR3/TNFRSF25, TRAIL
 R2/TNFRSF10B, DR6/TNFRSF21, TRAIL R3/TNFRSF10C, EDAR, TRAIL
 R4/TNFRSF10D, Fas/TNFRSF6, TROY/TNFRSF19, GITR/TNFRSF18,
 5 TWEAK R/TNFRSF12, HVEM/TNFRSF14, XEDAR, linfotóxina beta
 R/TNFRSF3, ligante de 4-1BB/TNFSF9, linfotóxina,
 APRIL/TNFSF13, linfotóxina beta/TNFSF3, BAFF/TNFSF13C,
 ligante de OX40/TNFSF4, ligante de CD27/TNFSF7,
 TL1A/TNFSF15, ligante de CD30/TNFSF8, TNF-alfa/TNFSF1A,
 10 ligante de CD40/TNFSF5, TNF-beta/TNFSF1B, EDA-A2,
 TRAIL/TNFSF10, ligante de Fas/TNFSF6, TRANCE/TNFSF11,
 ligante de GITR/TNFSF18, TWEAK/TNFSF12 e LIGHT/TNFSF14.

17. Proteína, de acordo com a reivindicação 13,
caracterizada pelo fato de que o membro da família Hedgehog
 15 é selecionado do grupo que consiste em *Patched* e
Smoothed.

18. Proteína, de acordo com a reivindicação 13,
caracterizada pelo fato de que a tirosina quinase receptora
 é selecionada do grupo que consiste em Axl, FGF R4, C1q
 20 R1/CD93, FGF R5, DDR1, Flt-3, DDR2, HGF R, Dtk, IGF-I R,
 EGF R, IGF-II R, Eph, INSR, EphA1, Insulina R/CD220,
 EphA2, M-CSF R, EphA3, Mer, EphA4, MSP R/Ron, EphA5, MuSK,
 EphA6, PDGF R alfa, EphA7, PDGF R beta, EphA8, Ret, EphB1,
 ROR1, EphB2, ROR2, EphB3, SCF R/c-kit, EphB4, Tie-1, EphB6,
 25 Tie-2, ErbB2, TrkA, ErbB3, TrkB, ErbB4, TrkC, FGF R1, VEGF
 R1/Flt-1, FGF R2, VEGF R2/Flk-1, FGF R3 e VEGF R3/Flt-4.

19. Proteína, de acordo com a reivindicação 13,
caracterizada pelo fato de que a molécula relacionada ao
 proteoglicano é selecionada do grupo que consiste em
 30 proteoglicanos e reguladores destes.

20. Proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o membro da superfamília do fator de transformação de crescimento (TGF)-beta é selecionado do grupo que consiste em Activina RIA/ALK-2, GFR alfa-1, Activina RIB/ALK-4, GFR alfa-2, Activina RIIA, GFR alfa-3, Activina RIB, GFR alfa-4, ALK-1, MIS RII, ALK-7, Ret, BMPR- IA/ALK-3, TGF-beta RFALK-5, BMPR-IB/ALK-6, TGF-beta RII, BMPR-II, TGF-beta RIIB, Endoglin/CD105 e TGF-beta RIII.

21. Proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a molécula relacionada a Wnt é selecionado do grupo que consiste em Frizzled-1, Frizzled-8, Frizzled-2, Frizzled-9, Frizzled-3, sFRP-1, Frizzled-4, sFRP-2, Frizzled-5, sFRP-3, Frizzled-6, sFRP-4, Frizzled-7, MFRP, LRP 5, LRP 6, Wnt-1, Wnt-8a, Wnt-3a, Wnt-10b, Wnt-4, Wnt-11, Wnt-5a, Wnt-9a e Wnt-7a.

22. Proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o ligante de receptor é selecionado do grupo que consiste em ligante de 4-1BB/TNFSF9, linfotoxina, APRIL/TNFSF13, linfotoxina beta/TNFSF3, BAFF/TNFSF13C, ligante de OX40/TNFSF4, ligante de CD27/TNFSF7, TL1A/TNFSF15, ligante de CD30/TNFSF8, TNF-alfa/TNFSF1A, ligante de CD40/TNFSF5, TNF-beta/TNFSF1B, EDA-A2, TRAIL/TNFSF10, ligante de Fas/TNFSF6, TRANCE/TNFSF11, ligante de GITR/TNFSF18, TWEAK/TNFSF12, LIGHT/TNFSF14, Anfiregulina, NRG1 isoforma GGF2, Betacelulina, NRG1 isoforma SMDF, EGF, NRG1-alfa/HRG1-alfa, Epigen, NRG1-beta 1/HRG1-beta 1, Epiregulina, TGF-alfa, HB-EGF, TMEFF1/Tomoregulina-1, Neuregulina-3, TMEFF2, IGF-I, IGF-II, Insulina, Activina A, Activina B, Activina AB,

Activina C, BMP-2, BMP-7, BMP-3, BMP-8, BMP-3b/GDF- 10,
 BMP-9, BMP-4, BMP-15, BMP-5, Decapentaplégico, BMP-6, GDF-
 1, GDF-8, GDF-3, GDF-9, GDF-5, GDF-11, GDF-6, GDF-15, GDF-
 7, Artemina, Neurturina, GDNF, Persefina, TGF-beta, TGF-
 5 beta 2, TGF-beta 1, TGF-beta 3, LAP (TGF-beta 1), TGF-beta
 5, TGF-beta Latente 1, TGF-beta Latente bpl, TGF-beta 1.2,
 Lefty, Nodal, MIS/AMH, FGF ácido, FGF-12, FGF básico, FGF-
 13, FGF-3, FGF-16, FGF-4, FGF-17, FGF-5, FGF-19, FGF-6,
 FGF-20, FGF-8, FGF-21, FGF-9, FGF-23, FGF-10, KGF/FGF-7,
 10 FGF-11, Neuropilina-1, PlGF, Neuropilina-2, PlGF-2, PDGF,
 PDGF-A, VEGF, PDGF-B, VEGF-B, PDGF-C, VEGF-C, PDGF-D, VEGF-
 D e PDGF-AB.

23. Proteína, de acordo com a reivindicação 13,
caracterizada pelo fato de que o receptor de célula T é
 15 selecionado do grupo que consiste em 2B4/SLAMF4, IL-2 R
 alfa, 4-1BB/TNFRSF9, IL-2 R beta, ALCAM, B7-1/CD80, IL-4 R,
 B7-H3, BLAME/SLAMF8, BTLA, IL-6 R, CCR3, IL-7 R alfa, CCR4,
 CXCR1/IL-8 RA, CCR5, CCR6, IL-10 R alfa, CCR7, IL-10 R
 beta, CCR8, IL-12 R beta 1, CCR9, IL-12 R beta 2, CD2, IL-
 20 13 R alfa 1, IL-13, CD3, CD4, ILT2/CD85j, ILT3/CD85k,
 ILT4/CD85d, ILT5/CD85a, Integrina alfa 4/CD49d, CD5,
 Integrina alfa E/CD103, CD6, Integrina alfa M/CD11b, CD8,
 Integrina alfa X/CD11c, Integrina beta 2/CD18, KIR/CD158,
 CD27/TNFRSF7, KIR2DL1, CD28, KIR2DL3, CD30/TNFRSF8,
 25 KIR2DL4/CD158d, CD31/PECAM-1, KIR2DS4, ligante de
 CD40/TNFSF5, LAG-3, CD43, LAIR1, CD45, LAIR2, CD83,
 Leucotrieno B4 R1, CD84/SLAMF5, NCAM-L1, CD94, NKG2A, CD97,
 NKG2C, CD229/SLAMF3, NKG2D, CD2F-10/SLAMF9, NT-4, CD69,
 NTB-A/SLAMF6, cadeia gama comum/IL-2 R gama, Osteopontina,
 30 CRACC/SLAMF7, PD-1, CRTAM, PSGL-1, CTLA-4, RANK/TNFRSF11A,

CX3CR1, CX3CL1, L-Selectina, CXCR3, SIRP beta 1, CXCR4, SLAM, CXCR6, TCCR/WSX-1, DNAM-1, Timopoietina, EMMPRIN/CD147, TIM- 1, EphB6, TIM-2, Fas/TNFRSF6, TIM-3, ligante de Fas/TNFSF6, TIM-4, Fc gama RIII/CD16, TIM-6,
 5 GITR/TNFRSF18, TNF RI/TNFRSF1A, Granulisina, TNF RIFTNFRSF1B, HVEM/TNFRSF14, TRAIL R1/TNFRSF10A, ICAM-1/CD54, TRAIL R2/TNFRSF10B, ICAM-2/CD102, TRAIL R3/TNFRSF10C, IFN-gama R1, TRAIL R4/TNFRSF10D, IFN-gama R2, TSLP, IL-1 RI e TSLP R.

10 24. Proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o receptor de célula NK é selecionado do grupo que consiste em 2B4/SLAMF4, KIR2DS4, CD155/PVR, KIR3DL1, CD94, LMIR1/CD300A, CD69, LMIR2/CD300c, CRACC/SLAMF7, LMIR3/CD300LF, DNAM-1, LMIR5/CD300LB, Fc
 15 épsilon RII, LMIR6/CD300LE, Fc gama RI/CD64, MICA, Fc gama RIIB/CD32b, MICB, Fc gama RIIC/CD32c, MULT-1, Fc gama RIIA/CD32a, Nectina-2/CD112, Fc gama RIII/CD16, NKG2A, FcRH1/IRTA5, NKG2C, FcRH2/IRTA4, NKG2D, FcRH4/IRTA1, NKp30, FcRH5/IRTA2, NKp44, Receptor Fc-like 3/CD16-2, NKp46/NCR1,
 20 NKp80/KLRP1, NTB-A/SLAMF6, Rae-1, Rae-1 alfa, Rae-1 beta, Rae-1 delta, H60, Rae-1 épsilon, ILT2/CD85j, Rae-1 gama, ILT3/CD85k, TREM-1, ILT4/CD85d, TREM-2, ILT5/CD85a, TREM-3, KIR/CD158, TREML1/TLT-1, KIR2DL1, ULBP-1, KIR2DL3, ULBP-2, KIR2DL4/CD158d e ULBP-3.

25 25. Proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o receptor celular de monócito/macrófago é selecionado do grupo que consiste em B7-1/CD80, ILT4/CD85d, B7-H1, ILT5/CD85a, cadeia beta
 comum, Integrina alfa 4/CD49d, BLAME/SLAMF8, Integrina alfa
 30 X/CD1 1c, CCL6/C10, Integrina beta 2/CD18, CD155/PVR,

Integrina beta 3/CD61, CD31/PECAM-1, Latexina, CD36/SR-B3, Leucotrieno B4R1, CD40/TNFRSF5, LIMP2/CD300A, CD43, LMIR1/CD300A, CD45, LMIR2/CD300c, CD68, LMIR3/CD300LF, CD84/SLAMF5, LMIR5/CD300LB, CD97, LMIR6/CD300LE, CD163, 5 LRP-1, CD2F-10/SLAMF9, MARCO, CRACC/SLAMF7, MD-1, ECF-L, MD-2, EMMPRIN/CD147, MGL2, Endoglina/CD105, Osteoactivina/GPNMB, Fc gama RI/CD64, Osteopontina, Fc gama RIIB/CD32b, PD-L2, Fc gama RIIC/CD32c, Siglec-3/CD33, Fc gama RIIA/CD32a, SIGNR1/CD209, Fc gama RIII/CD16, SLAM, GM-10 CSF R alfa, TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102, TLR3, IFN-gama R1, TLR4, IFN-gama R2, TREM-1, IL-1 RII, TREM-2, ILT2/CD85j, TREM-3, ILT3/CD85k, TREML1/TLT-1, 2B4/SLAMF4, IL-10 R alfa, ALCAM, IL-10 R beta, Aminopeptidase N/ANPEP, ILT2/CD85j, cadeia beta comum, ILT3/CD85k, C1q R1/CD93, ILT4/CD85d, 15 CCR1, ILT5/CD85a, CCR2, Integrina alfa 4/CD49d, CCR5, Integrina alfa M/CD11b, CCR8, Integrina alfa X/CD11c, CD155/PVR, Integrina beta 2/CD18, CD14, Integrina beta 3/CD61, CD36/SR-B3, LAIR1, CD43, LAIR2, CD45, Leucotrieno B4 R1, CD68, LIMP2/CD300A, CD97, 20 LMIR2/CD300c, CD163, LMIR3/CD300LF, fator da coagulação III/fator tecidual, LMIR5/CD300LB, CX3CR1, CX3CL1, LMIR6/CD300LE, CXCR4, LRP-1, CXCR6, M-CSF R, DEP-1/CD148, MD-1, DNAM-1, MD-2, EMMPRIN/CD147, MMR, Endoglina/CD105, NCAM-L1, Fc gama RI/CD64, PSGL-1, Fc gama RIII/CD16, RP105, 25 G-CSF R, L-Selectina, GM-CSF R alfa, Siglec-3/CD33, HVEM/TNFRSF14, SLAM, ICAM-1/CD54, TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102, TREM-1, IL-6 R, TREM-2, CXCR1/IL-8 RA, TREM-3 e TREML1/TLT-1.

26. Proteína, de acordo com a reivindicação 13, 30 caracterizada pelo fato de que o receptor de célula

dendrítica é selecionado do grupo que consiste em CD36/SR-B3, LOX-1/SR-E1, CD68, MARCO, CD163, SR-AI/MSR, CD5L, SREC-I, CL-Pl/COLEC12, SREC-II, LIMPII/SR-B2, RP105, TLR4, TLR1, TLR5, TLR2, TLR6, TLR3, TLR9, ligante de 4-1BB/TNFSF9, IL-12/IL-23 p40, 4-Amino-i,8-naftalimida, ILT2/CD85j, CCL21/6CKine, ILT3/CD85k, 8-oxo-dG, ILT4/CD85d, 8D6A, ILT5/CD85a, A2B5, Integrina alfa 4/CD49d, Aag, Integrina beta 2/CD18, AMICA, Langerina, B7-2/CD86, Leucotrieno B4 R1, B7-H3, LMIR1/CD300A, BLAME/SLAMF8, LMIR2/CD300c, C1q R1/CD93, LMIR3/CD300LF, CCR6, LMIR5/CD300LB, CCR7, LMIR6/CD300LE, CD40/TNFRSF5, MAG/Siglec-4a, CD43, MCAM, CD45, MD-1, CD68, MD-2, CD83, MDL-1/CLEC5A, CD84/SLAMF5, MMR, CD97, NCAM-L1, CD2F-10/SLAMF9, Osteoactivina/GPNMB, Chem 23, PD-L2, CLEC-1, RP105, CLEC-2, Siglec-2/CD22, CRACC/SLAMF7, Siglec-3/CD33, DC-SIGN, Siglec-5, DC-SIGNR/CD299, Siglec-6, DCAR, Siglec-7, DCIR/CLEC4A, Siglec-9, DEC-205, Siglec-10, Dectina-1/CLEC7A, Siglec-F, Dectina-2/CLEC6A, SIGNR1/CD209, DEP-1/CD148, SIGNR4, DLEC, SLAM, EMMPRIN/CD147, TCCR/WSX-1, Fc gama RI/CD64, TLR3, Fc gama RIIB/CD32b, TREM-1, Fc gama RIIC/CD32c, TREM-2, Fc gama RIIA/CD32a, TREM-3, Fc gama RIII/CD16, TREML1/TLT-1, ICAM-2/CD102 e Vanilóide R1.

27. Proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o alvo de angiogênese é selecionado do grupo que consiste em Angiopoietina-1, Angiopoietina-like 2, Angiopoietina-2, Angiopoietina-like 3, Angiopoietina-3, Angiopoietina-like 7/CDT6, Angiopoietina-4, Tie-1, Angiopoietina-like 1, Tie-2, Angiogenina, iNOS, fator da coagulação III/fator tecidual, nNOS, CTGF/CCN2, NOV/CCN3, DANCE, OSM, EDG-1, Plfr, EG-

VEGF/PK1, Proliferina, Endostatina, ROB04, Eritropoietina,
 Trombospondina-1, Cininostatina, Trombospondina-2, MFG-E8,
 Trombospondina-4, Óxido nítrico, VG5Q, eNOS, EphA1, EphA5,
 EphA2, EphA6, EphA3, EphA7, EphA4, EphA8, EphB1, EphB4,
 5 EphB2, EphB6, EphB3, Efrina-A1, Efrina-A4, Efrina-A2,
 Efrina-A5, Efrina-A3, Efrina-B1, Efrina-B3, Efrina-B2, FGF
 ácido, FGF-12, FGF básico, FGF-13, FGF-3, FGF-16, FGF-4,
 FGF-17, FGF-5, FGF-19, FGF-6, FGF-20, FGF-8, FGF-21, FGF-9,
 FGF-23, FGF-10, KGF/FGF-7, FGF-11, FGF R1, FGF R4, FGF R2,
 10 FGF R5, FGF R3, Neuropilina-1, Neuropilina-2, Semaforina
 3A, Semaforina 6B, Semaforina 3C, Semaforina 6C, Semaforina
 3E, Semaforina 6D, Semaforina 6A, Semaforina 7A, MMP, MMP-
 11, MMP-1, MMP-12, MMP-2, MMP-13, MMP-3, MMP-14, MMP-7,
 MMP-15, MMP-8, MMP-16/MT3-MMP, MMP-9, MMP-24/MT5-MMP, MMP-
 15 10, MMP-25/MT6-MMP, TIMP-1, TIMP-3, TIMP-2, TIMP-4, ACE,
 IL-13 R alfa 1, IL-13, C1q R1/CD93, Integrina alfa 4/CD49d,
 VE-Caderina, Integrina beta 2/CD18, CD31/PECAM-1, KLF4,
 CD36/SR-B3, LYVE-1, CD151, MCAM, CL-P1/COLEC12, Nectina-
 2/CD112, fator da coagulação III/fator tecidual, E-
 20 Selectina, D6, P-Selectina, DC-SIGNR/CD299, SLAM,
 EMMPRIN/CD147, Tie-2, Endogлина/CD105, TNF RI/TNFRSF1A,
 EPCR, TNF R1/TNFRSF1B, Eritropoietina R, TRAIL
 R1/TNFRSF10A, ESAM, TRAIL R2/TNFRSF10B, FABP5, VCAM-1,
 ICAM-1/CD54, VEGF R2/Flk-1, ICAM-2/CD102, VEGF R3/Flt-4,
 25 IL-1 RI e VG5Q.

28. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre o
 primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação
 se liga especificamente a um alvo selecionado do grupo que
 30 consiste em antígeno da membrana específico para a próstata

(folato hidrolase 1), receptor do fator de crescimento epidérmico, receptor para produtos finais de glicação avançada, IL-17 A, IL-17 F, P19, Dickkopf-1, NOTCH1, NG2, IgHE, IL-22R, IL-21, um oligômero de amilóide β , uma
 5 Proteína Precursora de amilóide β , Receptor NOGO (RTN4R), Proteína 5 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade, IL-4, miostatina, antígeno very late 4 e IGF-1R.

29. Proteína, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a célula cancerígena é uma
 10 célula hematopoiética transformada.

30. Proteína, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhece um alvo selecionado do grupo que consiste em um
 15 alvo de célula B, um alvo de célula T, um alvo de célula dendrítica, ou um alvo de célula NK.

31. Proteína, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação reconhece um alvo selecionado do grupo que consiste em CD5,
 20 CD10, CD11c, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27, CD30, CD38, CD45, CD70, CD80, CD86, CD103, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5, B-B2, B-B8 e receptor de antígeno de célula B.

25 32. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender uma sequência selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 2, 4, 6, 103, 105, 107, 109, 332, 333, 334 e 345.

33. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
 30 caracterizada por compreender uma sequência selecionada do

grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364 e 365.

34. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a sub-região constante
5 reconhece um receptor Fc de célula efetora.

35. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a sub-região constante reconhece uma proteína da superfície de uma célula efetora selecionada do grupo que consiste em CD16, CD32a, CD32b,
10 CD64, CD89, FcεR1, FcRn, e pIgR.

36. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a sub-região constante compreende um domínio C_{H2} e um domínio C_{H3}.

37. Proteína, de acordo com a reivindicação 36,
15 caracterizada pelo fato de que o domínio C_{H3} é truncado e compreende uma seqüência do terminal C selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 366, 367, 368, 369, 370 e 371.

38. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
20 caracterizada pelo fato de que o ligante *scorpion* é derivado de uma dobradiça de imunoglobulina.

39. Proteína, de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que o ligante *scorpion* possui um número reduzido, mas diferente de zero, de cisteínas em
25 relação à dobradiça da qual o ligante *scorpion* é derivado, e em que uma cisteína corresponde à cisteína da dobradiça do terminal N da dobradiça de imunoglobulina.

40. Proteína, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que o ligante *scorpion* é
30 derivado de uma região de dobradiça de IgG1 e em que o

ligante compreende 1 ou 2 cisteínas, ainda em que o ligante retém a cisteína que corresponde a uma cisteína da dobradiça do terminal N da região de dobradiça de IgG1.

41. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
5 caracterizada pelo fato de que o ligante *scorpion* é derivado da região peduncular de uma lectina C.

42. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizada pelo fato de que o ligante *scorpion* compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste
10 nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 373, 374, 375, 376 e 377.

43. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizada pelo fato de que o ligante *scorpion* compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste
nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 351, 352, 353 e 354.

15 44. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizada ainda por compreender um ligante de pelo menos cerca de 5 aminoácidos anexado à sub-região constante e anexado ao primeiro domínio de ligação localizando, dessa forma, o ligante entre a sub-região constante e o primeiro
20 domínio de ligação.

45. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizada pelo fato de que a afinidade de ligação de pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação é de menos de 10^{-9} M.

25 46. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizada pelo fato de que a afinidade de ligação de pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação é de pelo menos 10^{-6} M.

47. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
30 caracterizada pelo fato de que a função efetora é

selecionada do grupo que consiste em citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células (ADCC) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

48. Proteína, de acordo com a reivindicação 1,
5 caracterizada pelo fato de que a meia-vida *in vivo* da proteína é de pelo menos 28 horas em um ser humano.

49. Composição farmacêutica caracterizada por compreender a Proteína, de acordo com a reivindicação 1 e um adjuvante, veículo ou excipiente farmacêuticamente
10 aceitável.

50. Ácido nucléico caracterizado por codificar uma Proteína da reivindicação 1.

51. Vetor caracterizado por compreender um ácido nucléico de acordo com a reivindicação 50.

15 52. Célula hospedeira caracterizada por compreender um vetor da reivindicação 51.

53. Método de produção da Proteína da reivindicação 1 caracterizado por compreender:

a. introdução de um ácido nucléico que codifica a
20 Proteína, de acordo com a reivindicação 1 em um célula hospedeira; e

b. incubação da célula hospedeira sob condições adequadas à expressão da proteína expressando, dessa forma, a proteína em um nível de pelo menos 1 mg/ml.

25 54. Método, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado ainda por compreender o isolamento da proteína.

55. Método, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é
30 selecionada do grupo que consiste em uma célula VERO, uma

célula HeLa, uma célula CHO, uma célula COS, uma célula W138, uma célula BHK, uma célula HepG2, uma célula 3T3, uma célula RIN, uma célula MDCK, uma célula A549, uma célula PC12, uma célula K562, uma célula HEK293, uma célula N, uma
5 célula de *Spodoptera frugiperda*, uma célula de *Saccharomyces cerevisiae*, uma célula de *Pichia pastoris*, uma célula fúngica e uma célula bacteriana.

56. Método de produção de um ácido nucléico que codifica a Proteína da reivindicação 1 caracterizado por
10 compreender:

a. a ligação de forma covalente da extremidade 3' de um polinucleotídeo que codifica um primeiro domínio de ligação derivado da região variável de uma imunoglobulina à extremidade 5' de um polinucleotídeo que codifica uma sub-
15 região constante;

b. a ligação de forma covalente da extremidade 5' de um polinucleotídeo que codifica um ligante *scorpion* à extremidade 3' do polinucleotídeo que codifica a sub-região constante; e

20 c. a ligação de forma covalente da extremidade 5' de um polinucleotídeo que codifica um segundo domínio de ligação derivado da região variável de uma imunoglobulina à extremidade 3' do polinucleotídeo que codifica o ligante *scorpion* gerando, dessa forma, um ácido nucléico que
25 codifica uma proteína de ligação multivalente com função efetora.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo que codifica um primeiro domínio de ligação compreende uma
30 seqüência selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ.

Nº: 1 (região variável anti-CD20), ID. DE SEQ. Nº: 3 (região variável anti-CD28, orientada V_L-V_H) e ID. DE SEQ. Nº: 5 (região variável anti-CD28, orientada V_H-V_L).

58. Método, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado ainda por compreender um ligante polinucleotídico inserido entre o polinucleotídeo que codifica um primeiro domínio de ligação e o polinucleotídeo que codifica uma sub-região constante, o ligante polinucleotídico que codifica um ligante peptídico de pelo menos 5 aminoácidos.

59. Método, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado ainda por compreender um ligante polinucleotídico inserido entre o polinucleotídeo que codifica uma sub-região constante e o polinucleotídeo que codifica um segundo domínio de ligação, o ligante polinucleotídico que codifica um ligante peptídico de pelo menos 5 aminoácidos.

60. Método de indução de lesão a uma célula-alvo caracterizado por compreender o contato de uma célula-alvo com uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma Proteína, de acordo com a reivindicação 1.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que a célula-alvo é colocada em contato *in vivo* por administração da proteína a um organismo que necessita.

62. Método de tratamento de um distúrbio de proliferação celular caracterizado por compreender a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma Proteína, de acordo com a reivindicação 1 a um organismo que necessita.

63. Método, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o distúrbio é selecionado do grupo que consiste em um câncer, um distúrbio autoimune, uma infecção pelo vírus do sarcoma de Rous e uma
5 inflamação.

64. Método, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a proteína é administrada por expressão *in vivo* de um ácido nucléico que codifica a Proteína, de acordo com a reivindicação 1.

10 65. Método, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a proteína é administrada por uma via selecionada do grupo que consiste em injeção intravenosa, injeção intra-arterial, injeção intramuscular, injeção subcutânea, intraperitoneal injeção e injeção
15 direta no tecido.

66. Método para a atenuação de um sintoma associado a um distúrbio de proliferação celular caracterizado por compreender a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma Proteína, da reivindicação 1
20 a um organismo que necessita.

67. Método, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o sintoma é selecionado do grupo que consiste em dor, calor, edema e rigidez articular.

25 68. Método de tratamento de uma infecção associada a um agente infeccioso caracterizado por compreender a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da Proteína, de acordo com a reivindicação 1 a um paciente que necessita, em que a proteína compreende um domínio de
30 ligação que se liga especificamente a uma molécula-alvo do

agente infeccioso.

69. Método para a atenuação de um sintoma de uma infecção associada a um agente infeccioso caracterizado por compreender a administração de uma quantidade eficaz da Proteína, de acordo com a reivindicação 1 a um paciente que necessita, em que a proteína compreende um domínio de ligação que se liga especificamente a uma molécula-alvo do agente infeccioso.

70. Método de redução do risco de infecção atribuível a um agente infeccioso caracterizado por compreender a administração de uma quantidade profilaticamente eficaz da Proteína, de acordo com a reivindicação 1 a um paciente em risco de desenvolver a infecção, em que a proteína compreende um domínio de ligação que se liga especificamente a uma molécula-alvo do agente infeccioso.

71. Kit caracterizado por compreender a Proteína da reivindicação 1 e um conjunto de instruções para a administração da proteína para tratar um distúrbio de proliferação celular ou para atenuar um sintoma do distúrbio de proliferação celular.

72. Proteína de ligação multivalente de cadeia simples, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação se liga especificamente a um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 e um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal.

73. Proteína, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que um entre o primeiro domínio

de ligação e o segundo domínio de ligação se liga especificamente ao CD20.

74. Proteína, de acordo com a reivindicação 73, caracterizada pelo fato de que o outro domínio de ligação se liga especificamente a um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 e um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal.

10 75. Proteína, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação se liga especificamente ao CD79b.

76. Proteína, de acordo com a reivindicação 75, 15 caracterizada pelo fato de que o outro domínio de ligação se liga especificamente a um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 e um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal. 20

77. Proteína, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação se liga especificamente a um peptídeo da classe II do complexo de 25 histocompatibilidade principal.

78. Proteína, de acordo com a reivindicação 77, caracterizada pelo fato de que o outro domínio de ligação se liga especificamente a um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, 30 CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 e um

peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal.

79. Proteína, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que um entre o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação se liga especificamente ao CD22.

80. Proteína, de acordo com a reivindicação 79, caracterizada pelo fato de que o outro domínio de ligação se liga especificamente a um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 e um peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal.

81. Proteína, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que a proteína possui um efeito sinérgico sobre o comportamento de uma célula-alvo em relação à soma dos efeitos de cada um dos domínios de ligação, e em que a proteína compreende um par de domínios de ligação que reconhece especificamente um par de antígenos selecionados do grupo que consiste em CD20-CD19, CD20-CD21, CD20-CD22, CD20-CD40, CD20-CD79a, CD20-CD79b e CD20- CD81.

82. Proteína, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que a proteína possui um efeito aditivo sobre o comportamento de uma célula-alvo em relação à soma dos efeitos de cada um dos domínios de ligação, e em que a proteína compreende um par de domínios de ligação que reconhece especificamente um par de antígenos selecionados do grupo que consiste em CD20-CD23, CD20-CD30, CD20-CD37, CD20-CD70, CD20-CD80, CD20-CD86, CD79b-CD37, CD79b-CD81,

peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD30 e peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD72.

83. Proteína, de acordo com a reivindicação 72,
 5 caracterizada pelo fato de que a proteína possui um efeito inibidor sobre o comportamento de uma célula-alvo em relação à soma dos efeitos de cada um dos domínios de ligação, e em que a proteína compreende um par de domínios de ligação que reconhece especificamente um par de
 10 antígenos selecionados do grupo que consiste em CD20-peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal, CD79b-CD19, CD79b-CD20, CD79b-CD21, CD79b-CD22, CD79b-CD23, CD79b-CD30, CD79b-CD40, CD79b-CD70, CD79b-CD72, CD79b-CD79a, CD79b-CD80, CD79b-CD86, CD79b-peptídeo da
 15 classe II do complexo de histocompatibilidade principal, peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD19, peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD20, peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD21,
 20 peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD22, peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD23, peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD37, peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD40, peptídeo da classe II do complexo de
 25 histocompatibilidade principal-CD70, peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD79a, peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD79b, peptídeo da classe II do complexo de
 30 histocompatibilidade principal-CD80, peptídeo da classe II

do complexo de histocompatibilidade principal-CD81, peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal-CD86, CD22-CD19, CD22-CD40, CD22-CD79b, CD22-CD86 e CD22-peptídeo da classe II do complexo de histocompatibilidade principal.

84. Método de identificação de pelo menos um dos domínios de ligação da molécula de ligação multivalente da reivindicação 1 caracterizado por compreender:

(a) o contato de um anticorpo anti-isotípico com um anticorpo que reconhece especificamente um primeiro antígeno e um anticorpo que reconhece especificamente um segundo antígeno;

(b) o contato adicional de um alvo que compreende pelo menos um dos antígenos com a composição da etapa (a); e

(c) a medida de uma atividade do alvo, em que a atividade é usada para identificar pelo menos um dos domínios de ligação da molécula de ligação multivalente.

85. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que o alvo é uma célula doente.

86. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que a proteína de ligação multivalente de cadeia simples induz uma quantidade de lesão sinérgica à célula-alvo comparada à soma da lesão induzida por um primeiro anticorpo que compreende o primeiro domínio de ligação, mas não o segundo domínio de ligação, e um segundo anticorpo que compreende o segundo domínio de ligação, mas não o primeiro domínio de ligação.

87. Método, de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que a proteína de ligação multivalente de cadeia simples compreende um par de

domínios de ligação que reconhece especificamente um par de antígenos selecionados do grupo que consiste em CD19/CD20, CD20/CD21, CD20/CD22, CD20/CD40, CD20/CD79a, CD20/CD79b, CD20/CD81, CD21/CD79b, CD37/CD79b, CD79b/CD81, CD19/CL II, 5 CD20/CL II, CD30/CL II, CD37/CL II, CD72/CL II e CD79b/CL II.

88. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que a proteína de ligação multivalente de cadeia simples induz uma quantidade inibida 10 de lesão à célula-alvo comparada à soma da lesão induzida por um primeiro anticorpo que compreende o primeiro domínio de ligação, mas não o segundo domínio de ligação, e um segundo anticorpo que compreende o segundo domínio de ligação, mas não o primeiro domínio de ligação.

89. Método, de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de que a proteína de ligação multivalente de cadeia simples compreende um par de domínios de ligação que reconhece especificamente um par de antígenos selecionados do grupo que consiste em CD20/CL II, 20 CD21/CD79b, CD22/CD79b, CD40/CD79b, CD70/CD79b, CD72/CD79b, CD79a/CD79b, CD79b/CD80, CD79b/CD86, CD21/CL II, CD22/CL II, CD23/CL II, CD40/CL II, CD70/CL II, CD80/CL II, CD86/CL II, CD19/CD22, CD20/CD22, CD21/CD22, CD22/CD23, CD22/CD30, CD22/CD37, CD22/CD40, CD22/CD70, CD22/CD72, CD22/79a, 25 CD22/79b, CD22/CD80, CD22/CD86 e CD22/CL II.

90. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado ainda por compreender diversas proteínas de ligação multivalentes de cadeia simples.

91. Método, de acordo com a reivindicação 90, 30 caracterizado pelo fato de que um domínio de ligação de uma

primeira proteína de ligação multivalente de cadeia simples e um domínio de ligação de uma segunda proteína de ligação multivalente de cadeia simples induzem uma quantidade de lesão sinérgica à célula-alvo.

5 92. Método, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que um domínio de ligação de uma primeira proteína de ligação multivalente de cadeia simples e um domínio de ligação de uma segunda proteína de ligação multivalente de cadeia simples induzem uma quantidade
10 inibida de lesão à célula-alvo.

93. Composição caracterizada por compreender diversas proteínas de ligação multivalentes de cadeia simples da reivindicação 1.

94. Composição, de acordo com a reivindicação 93,
15 caracterizada pelo fato de que um domínio de ligação de uma primeira proteína de ligação multivalente de cadeia simples e um domínio de ligação de uma segunda proteína de ligação multivalente de cadeia simples são capazes de induzir uma quantidade de lesão sinérgica to uma célula-alvo.

20 95. Composição, de acordo com a reivindicação 93, caracterizada pelo fato de que um domínio de ligação de uma primeira proteína de ligação multivalente de cadeia simples e um domínio de ligação de uma segunda proteína de ligação multivalente de cadeia simples são capazes de induzir uma
25 quantidade aditiva de lesão to uma célula-alvo.

96. Composição, de acordo com a reivindicação 93, caracterizada pelo fato de que um domínio de ligação de uma primeira proteína de ligação multivalente de cadeia simples e um domínio de ligação de uma segunda proteína de ligação
30 multivalente de cadeia simples são capazes de induzir uma

quantidade inibida de lesão to uma célula-alvo.

97. Composição farmacêutica caracterizada por compreender a composição da reivindicação 93 e um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

5 98. Kit caracterizado por compreender a composição da reivindicação 93 e um conjunto de instruções para a administração da composição to lesão uma célula-alvo.



FIG. 1

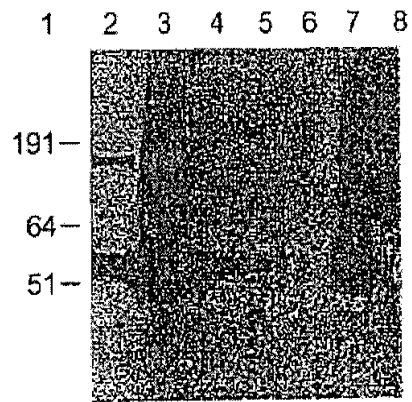
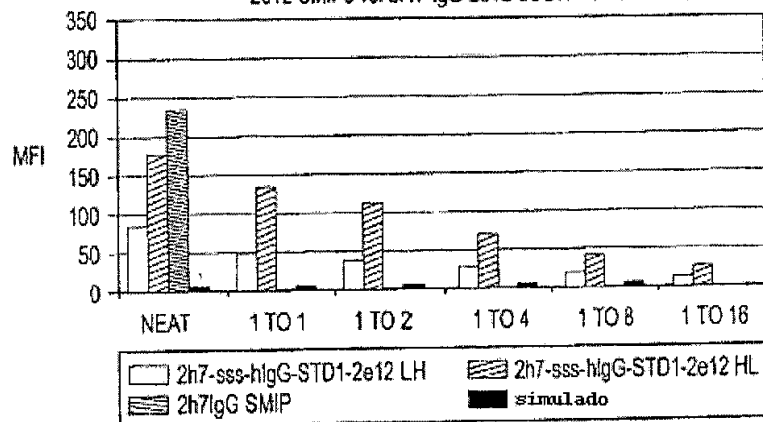


FIG. 2

FIG. 3

LIGAÇÃO DE PROTEÍNA EXPRESSA EM SOBRENADANTES DE COS
PARA CÉLULAS QUE EXPRESSAM ANTÍGENOS ALVO

A. LIGAÇÃO DE SOBRENADANTES DE COS A CÉLULAS WIL-2S
2e12 SMIPs vs. 2H7-IgG-2e12 SCORPIONS



B. LIGAÇÃO DE SOBRENADANTES DE COS A CÉLULAS CD28 OHO
2e12 SMIPs vs. 2H7-2e12 SCORPIONS

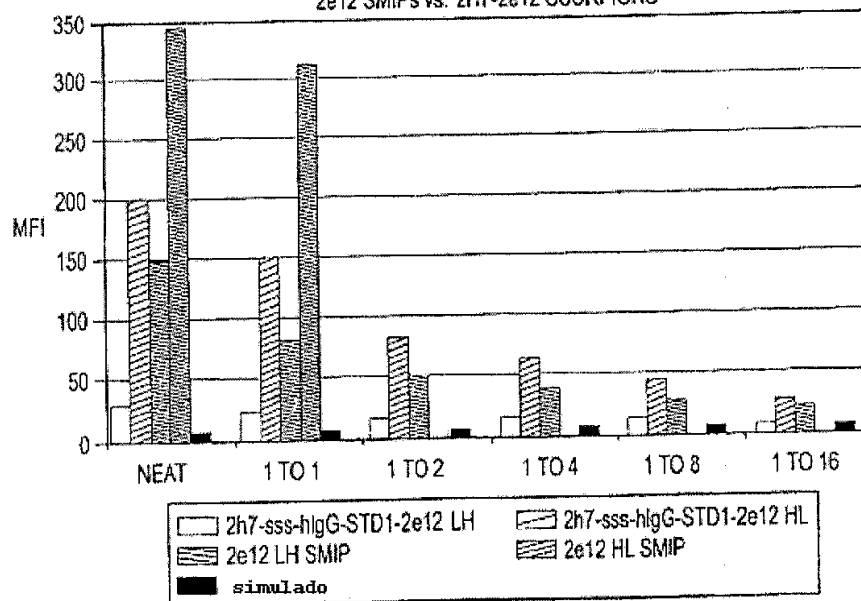


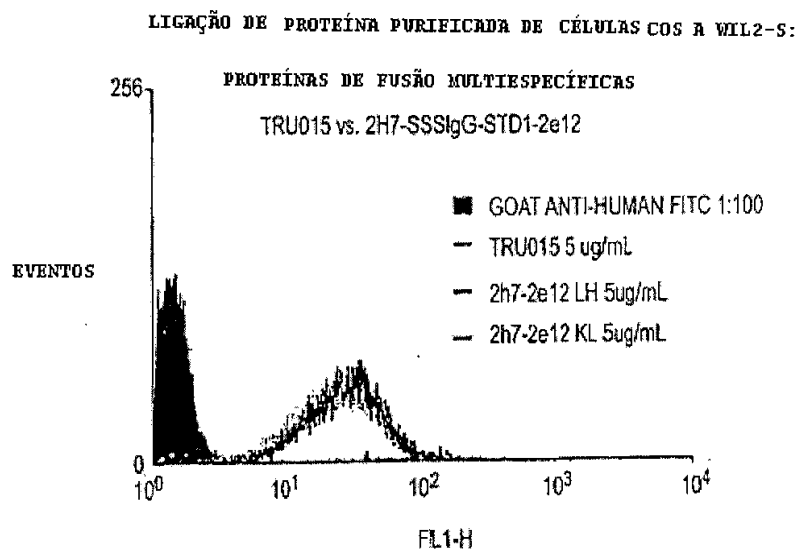
FIG. 4

FIG. 5

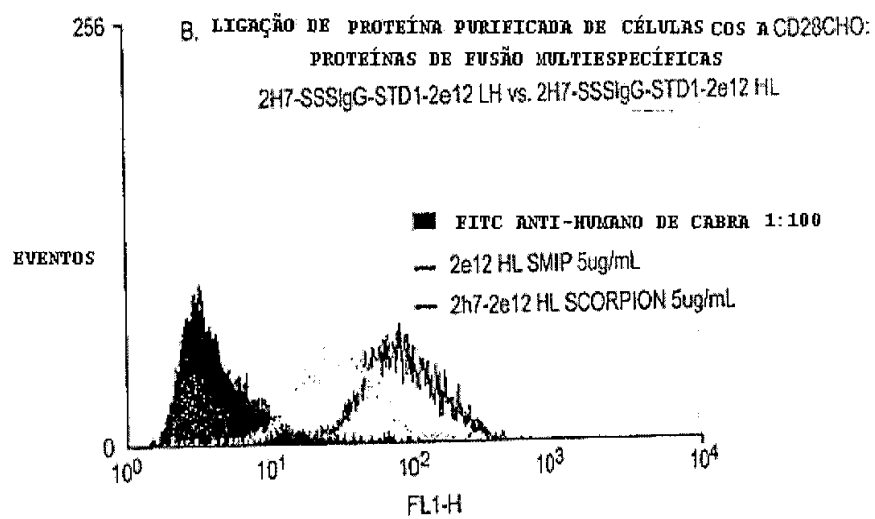
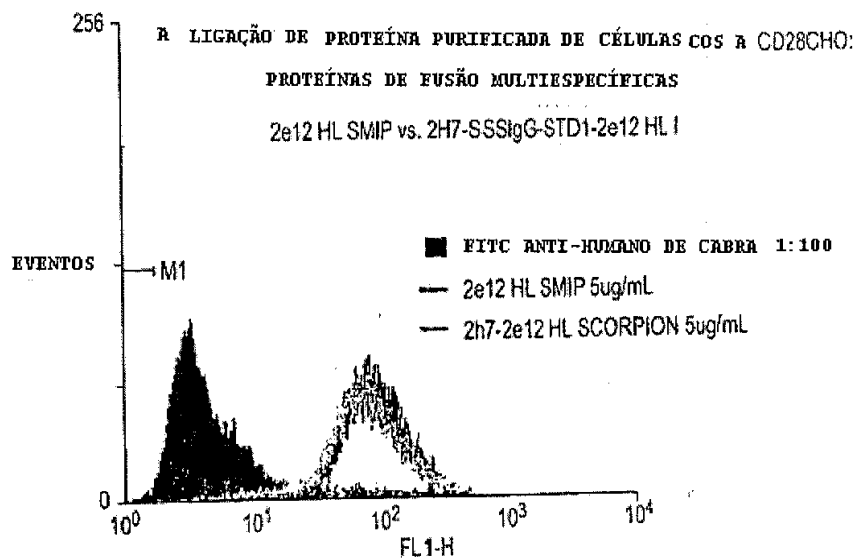


FIG. 6A

TABELA QUE IDENTIFICA ELEMENTOS FUNCIONAIS DE PROTEÍNAS DE FUSÃO MULTIESPECÍFICAS

BD1		EFD		BD2				
Domínio de ligação 1 BD1	Vinc. 1	domínio de função efetora EFD	Vinc. 2 ID	Comp. de Vinc. (aa) Vinc. mais Sítio R	CH3 COOH	Seq. de vinc. 2 (-sítio de restrição)	Junção de fusão com BD2 (L2 RS--QVQ 2e12)	Domínio de ligação 2 BD 2
2H7 VL-VH	Dobra hlgG1 modif. CCC>SSS	hlgG1- CH2-CH3	STD	20	PGK	MYGGGSGGGGSGGGSG	NS QVQ	2e12 VH-VL
2H7 VL-VH	Dobra hlgG1 modif. CCC>SSS	hlgG1- CH2-CH3	STD2	38	PGK	MYGGGSGGGGSGGGSG MYGGGSGGGGSGGGSG	NS QVQ	2e12 VH-VL
2H7 VL-VH	Dobra hlgG1 modif. CCC>SSS	hlgG1- CH2-CH3	H1 L1=2e12 VL-VH	2 (RS)	PGK	-	NS QVQ	2e12 VH-VL
2H7 VL-VH	Dobra hlgG1 modif. CCC>SSS	hlgG1- CH2-CH3	H2 L2=2e12 VL-VH	8	PGK	GGGGSG	NS QVQ	2e12 VH-VL
2H7 VL-VH	Dobra hlgG1 modif. CCC>SSS	hlgG1- CH2-CH3	H3 L3=2e12 VL-VH	10	PGK	NYGGGSG	NS QVQ	2e12 VH-VL
2H7 VL-VH	Dobra hlgG1 modif. CCC>SSS	hlgG1- CH2-CH3	H4 L4=2e12 VL-VH	13	PGK	GGGGSGGGGSG	NS QVQ	2e12 VH-VL
2H7 VL-VH	Dobra hlgG1 modif. CCC>SSS	hlgG1- CH2-CH3	H5 L5=2e12 VL-VH	15	PGK	NYGGGSGGGGSG	NS QVQ	2e12 VH-VL
2H7 VL-VH	Dobra hlgG1 modif. CCC>SSS	hlgG1- CH2-CH3	H6 L6=2e12 VL-VH	18	PGK	GGGGSGGGGSGGGGSG	NS QVQ	2e12 VH-VL
2H7 VL-VH	Dobra hlgG1 modif. CCC>SSS	hlgG1- CH2-CH3	H7	8	PGK	GCPC ²	NS QVQ	2e12 VH-VL

FIG. 6B (1 de 5)
Construções

Nome	BD1	Dobrad.	EFD	Vinc.	BD2
2H7-sss-hlgG-STD1-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-STD1-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-STD2-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-STD2-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-STD1-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-STD2-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-STD1-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-STD2-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H1-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H1-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H1-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-H1-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H2-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-H2-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H2-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-H2-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H3-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H3-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H3-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-H3-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H4-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H4-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H4-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-H4-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	2e12 (VH-VL)

FIG. 6B (2 de 5)

Nome	BD1	Dobrad.	EF0	Vinc.	BD2
2H7-sss-hlgG-H5-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H5-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H5-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-H5-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H6-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H6-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H6-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-H6-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H7-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H7-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H7-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-H7-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-STD1-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	G28-1 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-STD1-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	G28-1 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-STD2-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	G28-1 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-STD2-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	G28-1 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-STD1-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-STD2-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	G28-1 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-STD1-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-STD2-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H1-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H1-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H1-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H1-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H2-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	G28-1 (VL-VH)

FIG. 6B (3 de 5)

Nome	BD1	Dobrad.	EFD	Vinc.	BD2
2H7-csc-hlgG-H2-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H2-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H2-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H3-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H3-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H3-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H3-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H4-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H4-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H4-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H4-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H5-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H5-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H5-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H5-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H6-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H6-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H6-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H6-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H7-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H7-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H7-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H7-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-STD1-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-STD1-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	G19-4 (VH-VL)

FIG. 6B (4 de 5)

Nome	BD1	Bobrad.	EFD	Vinc.	BD2
2H7-sss-hlgG-STD2-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-STD2-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	G19-4 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-STD1-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-STD2-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	G19-4 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-STD1-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD1	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-STD2-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	STD2	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H1-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H1-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H1-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H1-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H1	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H2-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H2-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H2-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H2-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H2	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H3-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H3-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H3-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H3-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H3	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H4-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H4-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H4-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H4-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H4	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H5-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H5-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1-csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H5-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1-SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	G19-4 (VL-VH)

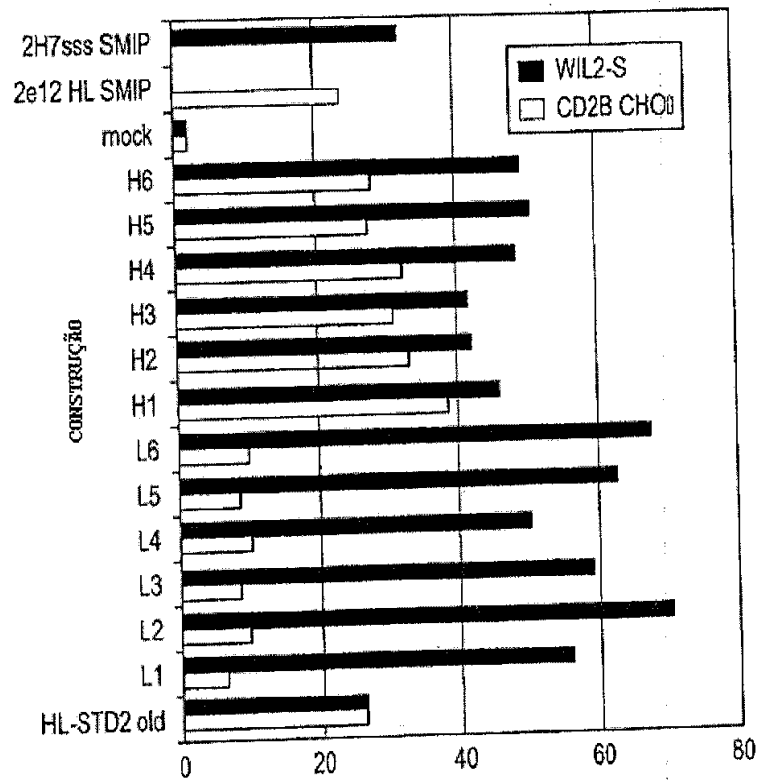
FIG. 6B (5 de 5)

Nome	BD1	Dobrad.	EFD	Vinc.	BD2
2H7-csc-hlgG-H5-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H5	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H6-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H6-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H6-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	G19-4 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-H6-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H6	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hlgG-H7-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hlgG-H7-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hlgG-H7-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -SSS	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	G19-4 (VH-VL)
2H7-csc-hlgG-H7-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hlgG1 -csc	hlgG ou hlgG (P238S/P331S)	H7	G19-4 (VH-VL)

FIG. 7

ALTERAÇÃO DO VINC. APÓS EFD E A ORIENTAÇÃO DE REGIÕES V EM BD2 AFETA
A EFICIÊNCIA DE LIGAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO MULTIESPECÍFICAS

LIGAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO ESPECÍFICAS 2H7-SSShlgG-L/Hx-2e12
COM VÁRIOS VINC. PARA WIL2-S E CHOCD28



** TODAS AS PROTEÍNAS DE FUSÃO USADAS A 0,72 UG/mL, PROTEÍNA A PURIFICADA,
GERADAS A PARTIR DE SOBRENADANTES DE cos TRANSITÓRIOS

FIG. 8

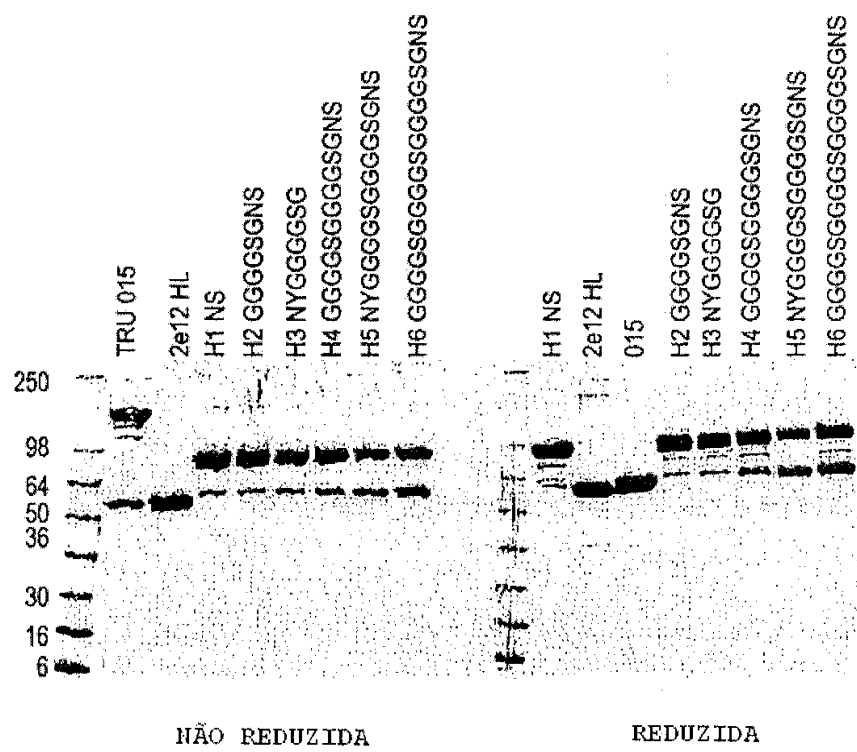


FIG. 9

Western blots de proteínas de fusão multiespecíficas com
vinculador H⁶

- A. Ausência de SMIP ou formas menores detectáveis de CD28
B. Presença de uma forma dimensionada de SMIP com o uso de
Fab de CD20 anti-id

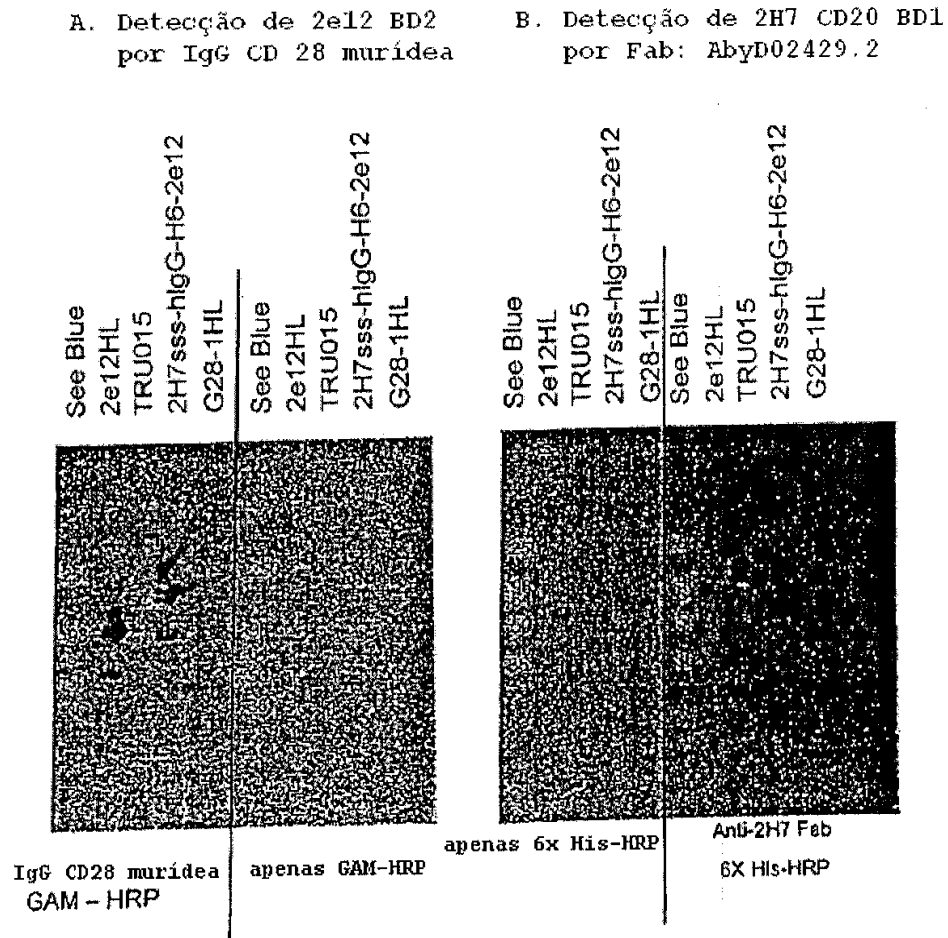
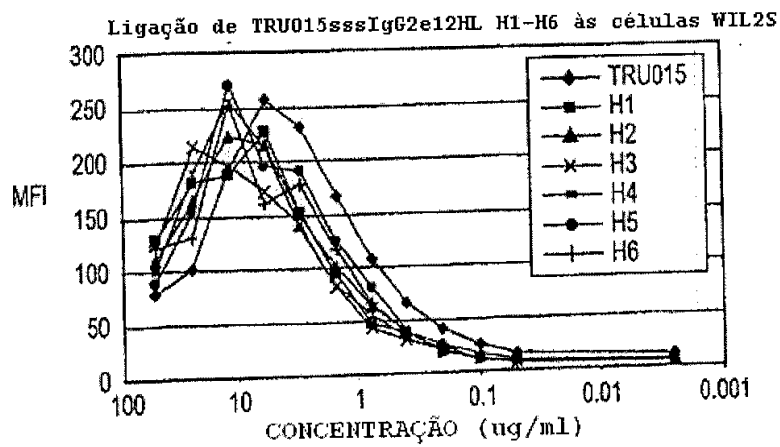


FIG. 10

A. Ligação de proteínas de fusão com vinculadores variantes às células WIL-2S



B. Ligação de proteínas de fusão com vinculadores variantes às células CHO CD28

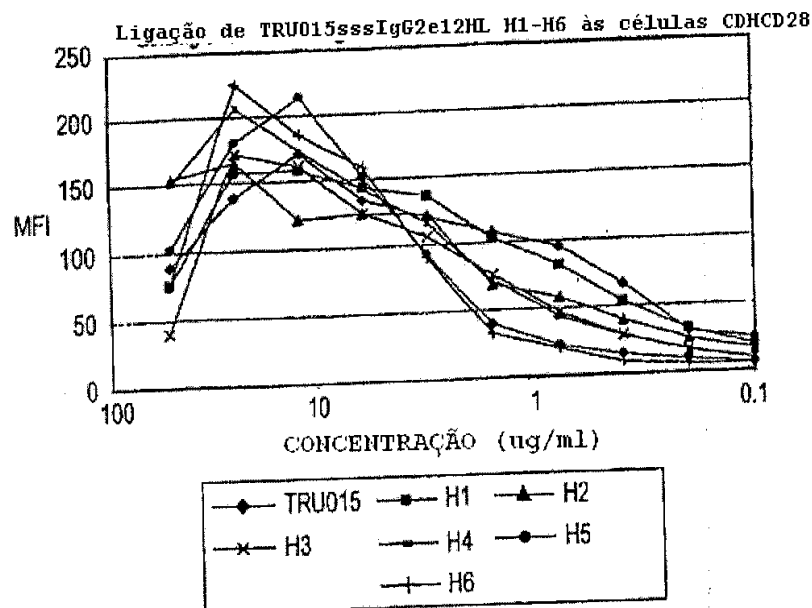


FIG. 11

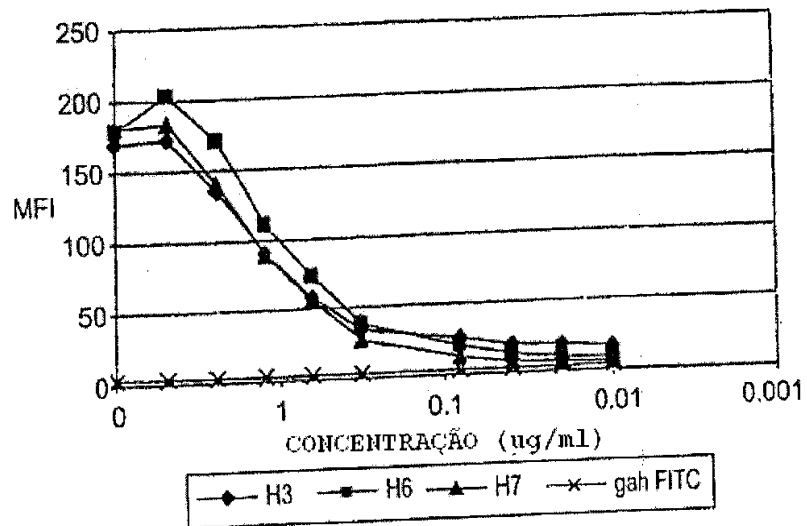
Resumo do fracionamento por SEC de proteínas de fusão
multiespecíficas com vinculadores variantes
2H7-sssIgG-2e12 HL

ID do vinculador	Tempo de retenção para POI	% POI	% de outras formas	Análise SDS-PAGE da clivagem na junção EED-BD2
H1	7.620	70.9	29.0	(Sim)
H2	7.589	67.5	32.5	(Sim)
H3	7.605	68.7	31.4	Sim
H4	7.622 (ressalto)	68.0	32.0	Sim
H5	7.933/7.680 (duplete com ressalto)	32.42/33.94	33.63	SIM
H6	7.901/7.69 (duplete com ressalto)	34.5/29.3	36.1	SIM
H7	7.788	84.2	15.8 (HMW)	NÃO

FIG. 12

Ligação de proteínas de fusão [2H7-sss-hIgG-Hx-2212 HL] com diferentes vinculadores às células que expressam antígeno-alvo por BD1 ou BD2

A. WIL-2S que expressam CD20



B. Células CHO CD28

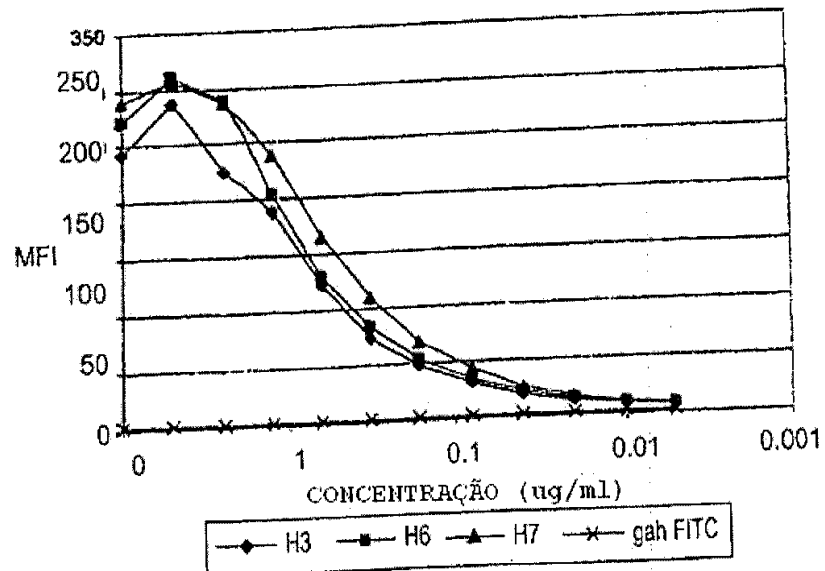


FIG. 13

Ligação simultânea de BD1 e BD2:

Ligação de proteínas de fusão [2H7-sss-hIgG-Hx-2e12 HL] com vinculadores H2, H6 e H7 às células WIL-2S. As células podem ser detectadas com CD28mIgG + FITC anticamundongo

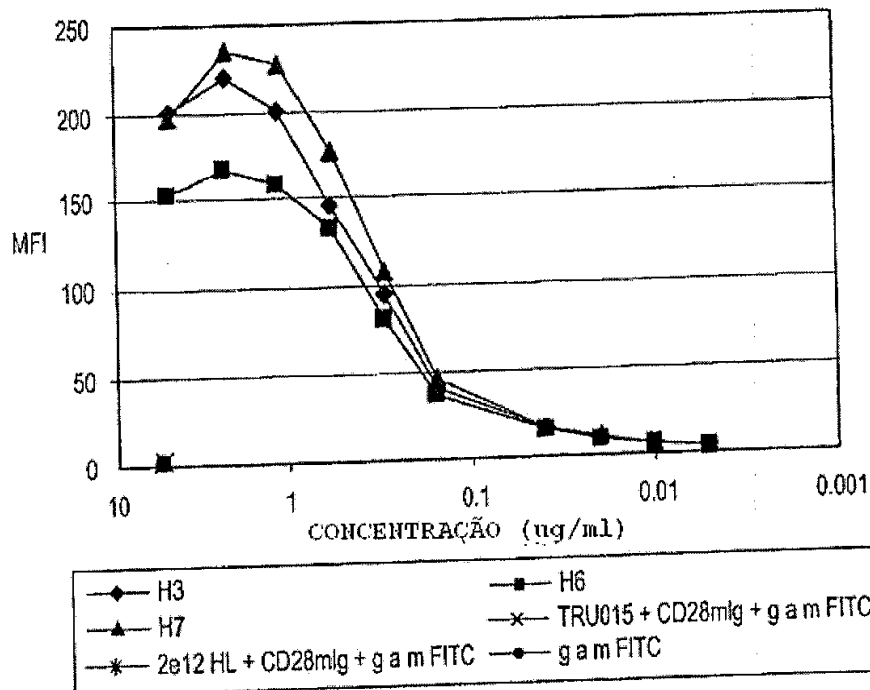
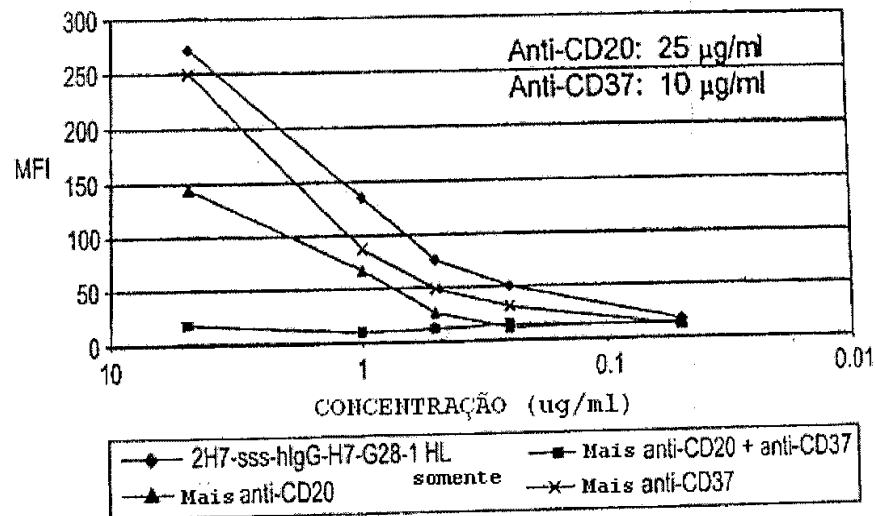


FIG. 14

A. Bloqueio da ligação da proteína
2H7-sss-hIgG-H7-G28-1 HL às células Ramos por
anticorpos dirigidos a CD20 e/ou CD37



B. Bloqueio da ligação de 2H7-sss-hIgG-H7-G28-1
HL às células BJAB por anticorpos dirigidos a CD20
e/ou CD37

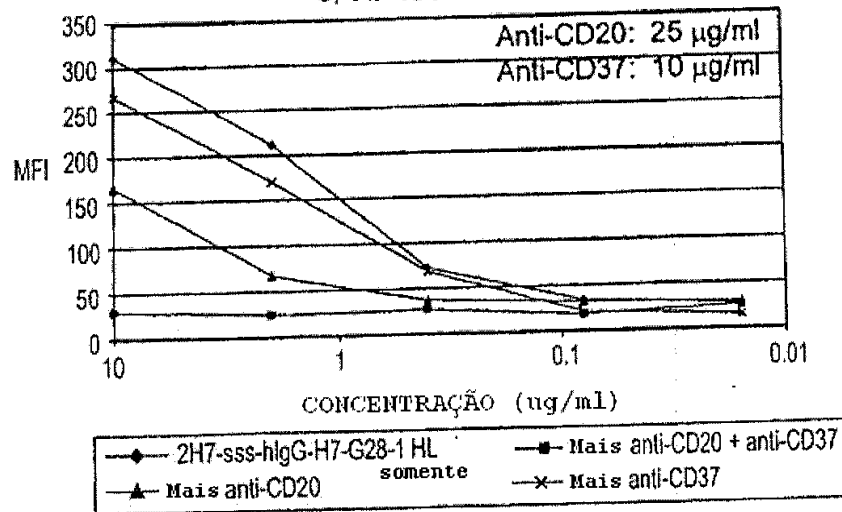


FIG. 15

Atividade de ADCC de variantes de
2H7-sss-hIgG-STD1-G28-1 contra alvos BJAB

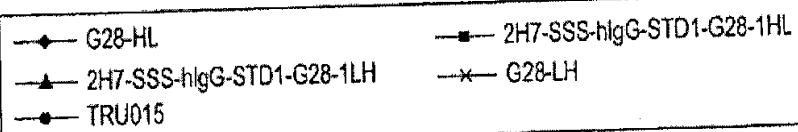
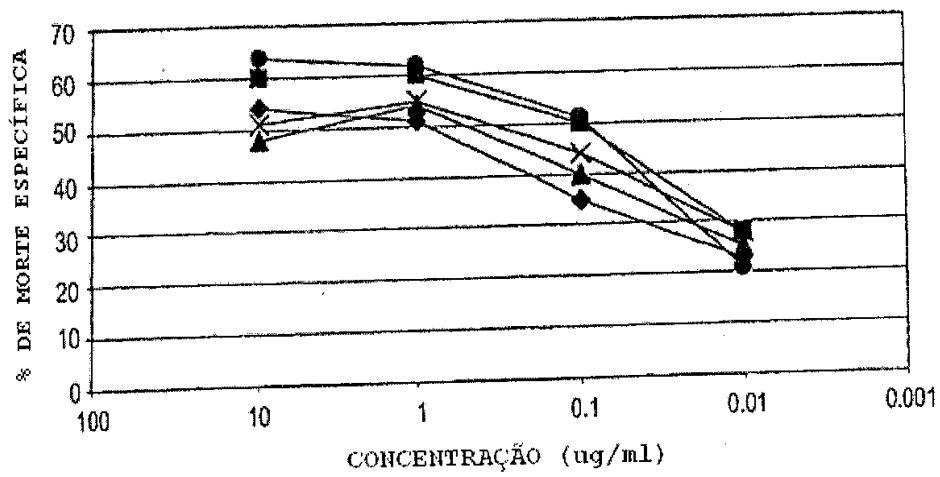


FIG. 16

O percentual de linfócitos positivos para CD3, CD19 e CD40 presentes em cultura após incubação com TRU-015, G28-1 SMIP, TRU-015+G28-1 SMIP ou 2H7-sss-hIgG1-H7-G28-1 HL

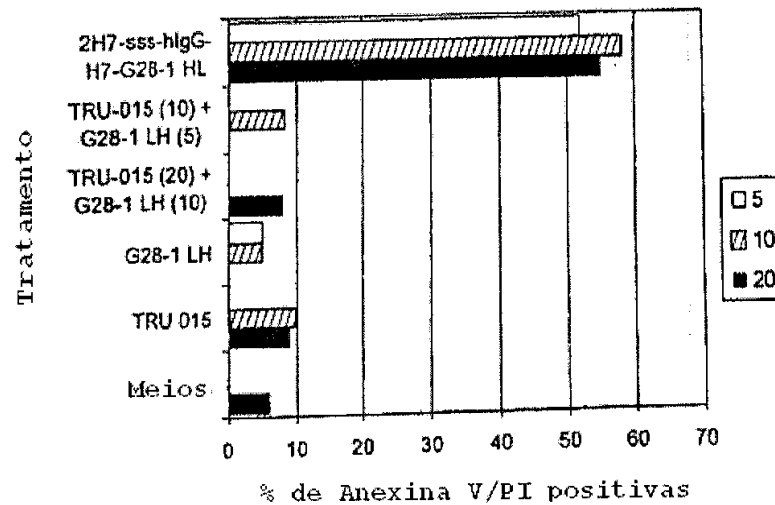
24 horas	CD3*	CD19*	CD40*
Meios	77%	8%	7%
TRU015	76%	8.5%	7.9%
G28-1 SMIP	78%	8.9%	7.8%
TRU015+G28-1 SMIP	76.3%	8.1%	7.5%
2H7-ssshlgG1-G28-1HL (H7)	78.4%	8.9%	7.9%

72 horas	CD3*	CD19*	CD40*
Meios	78.5%	7.9%	7.7%
TRU015	85.2%	2.3%	2.7%
G28-1 SMIP	86.7%	2.2%	2.3%
TRU015+G28-1 SMIP	87.1%	1.1%	1.1%
2H7-ssshlgG1-G28-1 HL (H7)	96.7%	.08%	.77%

FIG. 17

O percentual de células B positivas para Anexina e/ou PI após incubação por 24 horas com proteínas de fusão multiespecíficas ou com especificidade única

A. Células Ramos:



B. Células DAUDI:

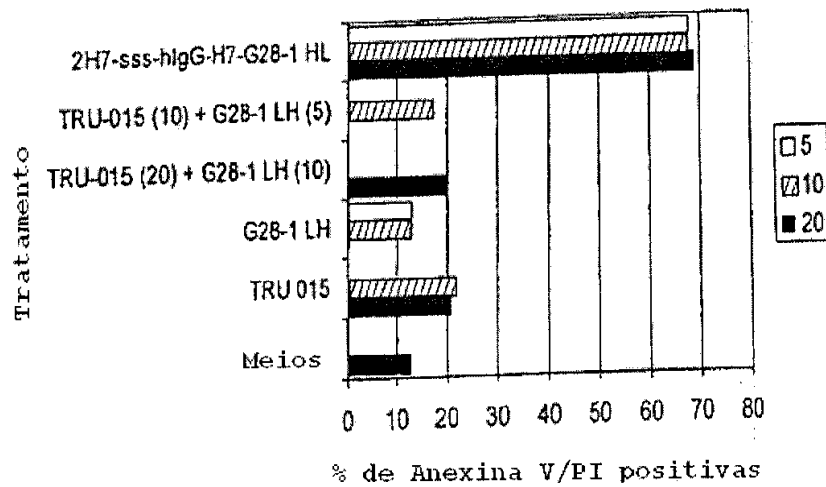
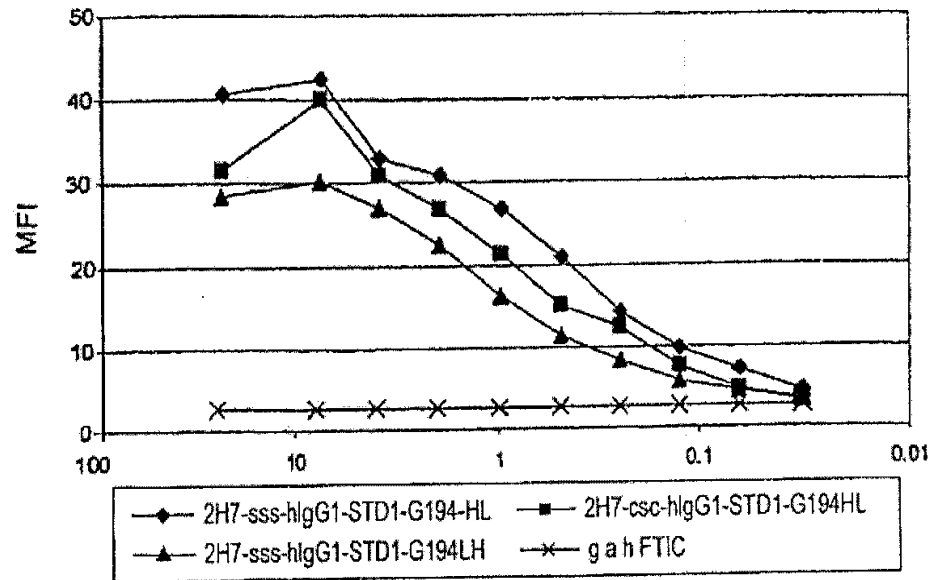


FIG. 18

A. Ligação de proteínas de fusão 2H7-hIgG-G19-4 às células Jurkat



B. Ligação 2H7-hIgG-G19-4 às células WIL2S

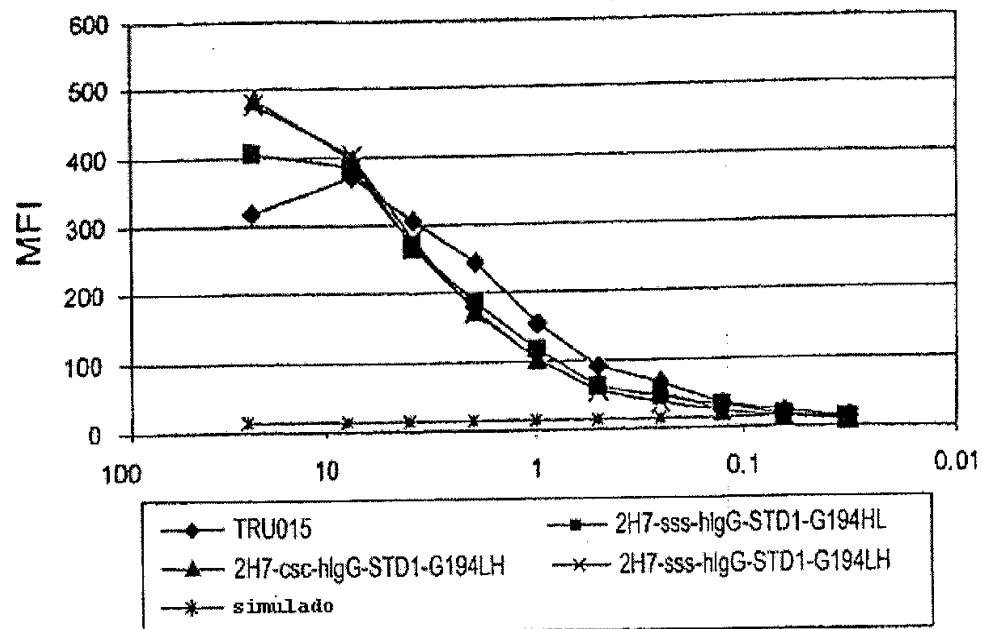
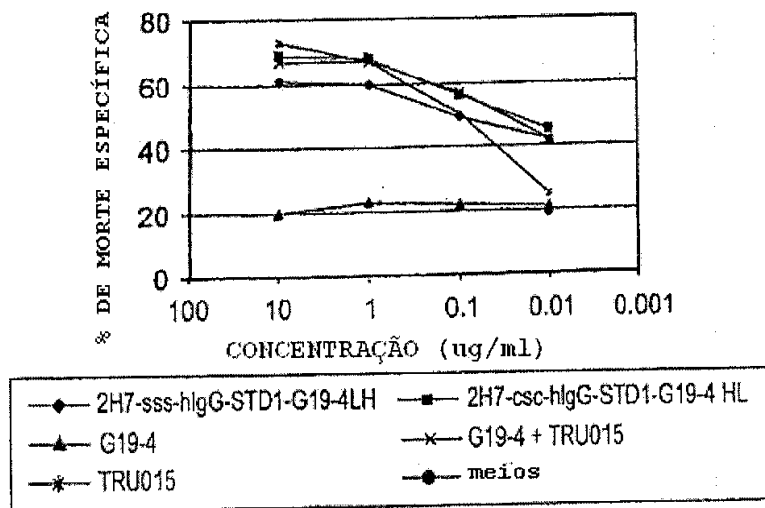


FIG. 19

A. Atividade de ADCC de proteínas de fusão multiespecíficas 2H7-G19-4 contra alvos BJAB usando efetores de PBMC humanas



B. Atividade de ADCC em culturas efetoras de PBMC sem células NK contra alvos BJAB (30:1. E:T) e proteínas de fusão 2H7-G19-4

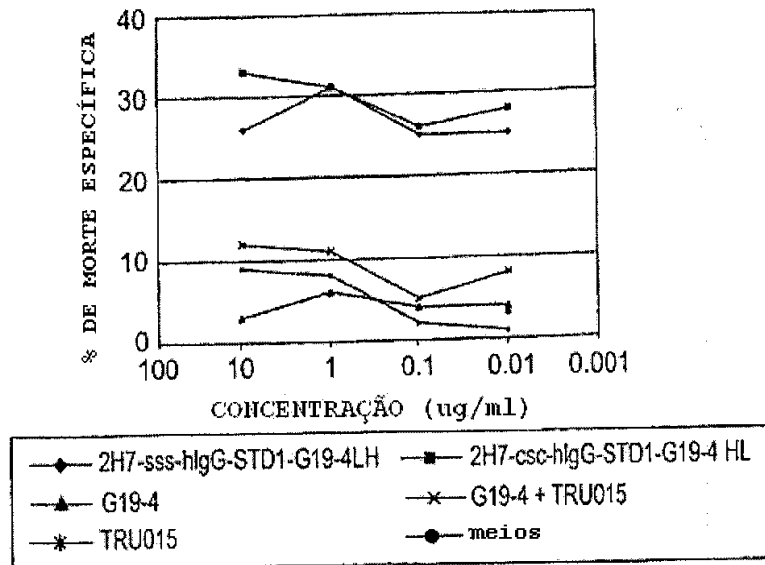


FIG. 20

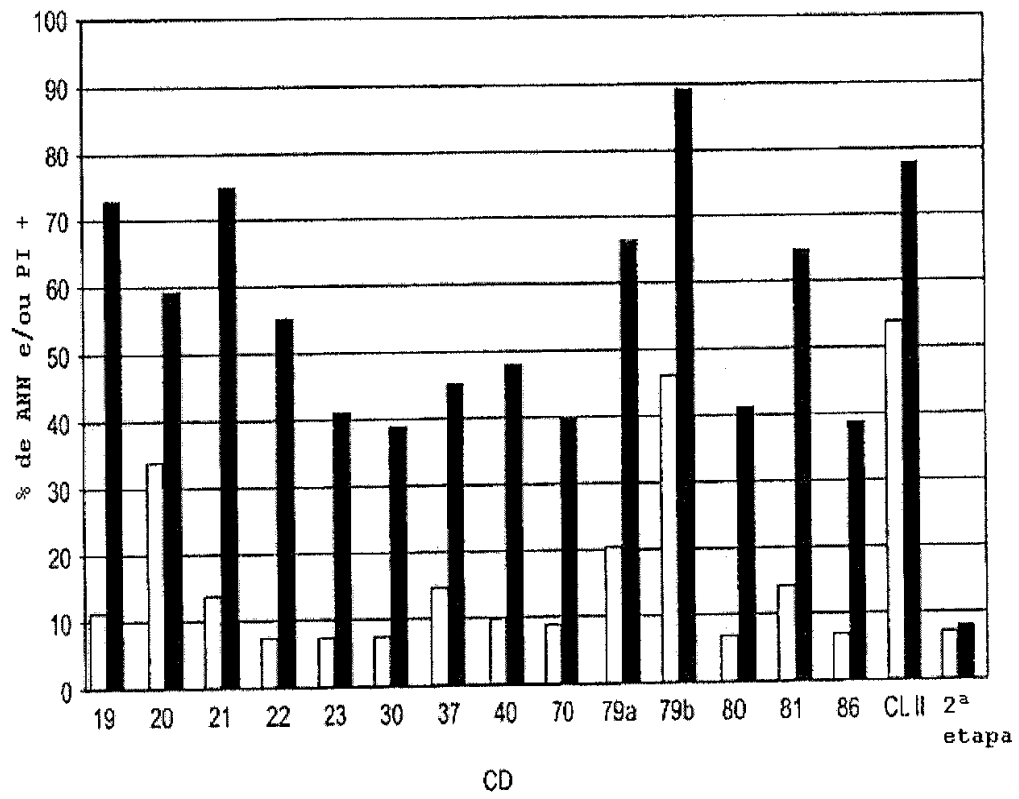


FIG. 21

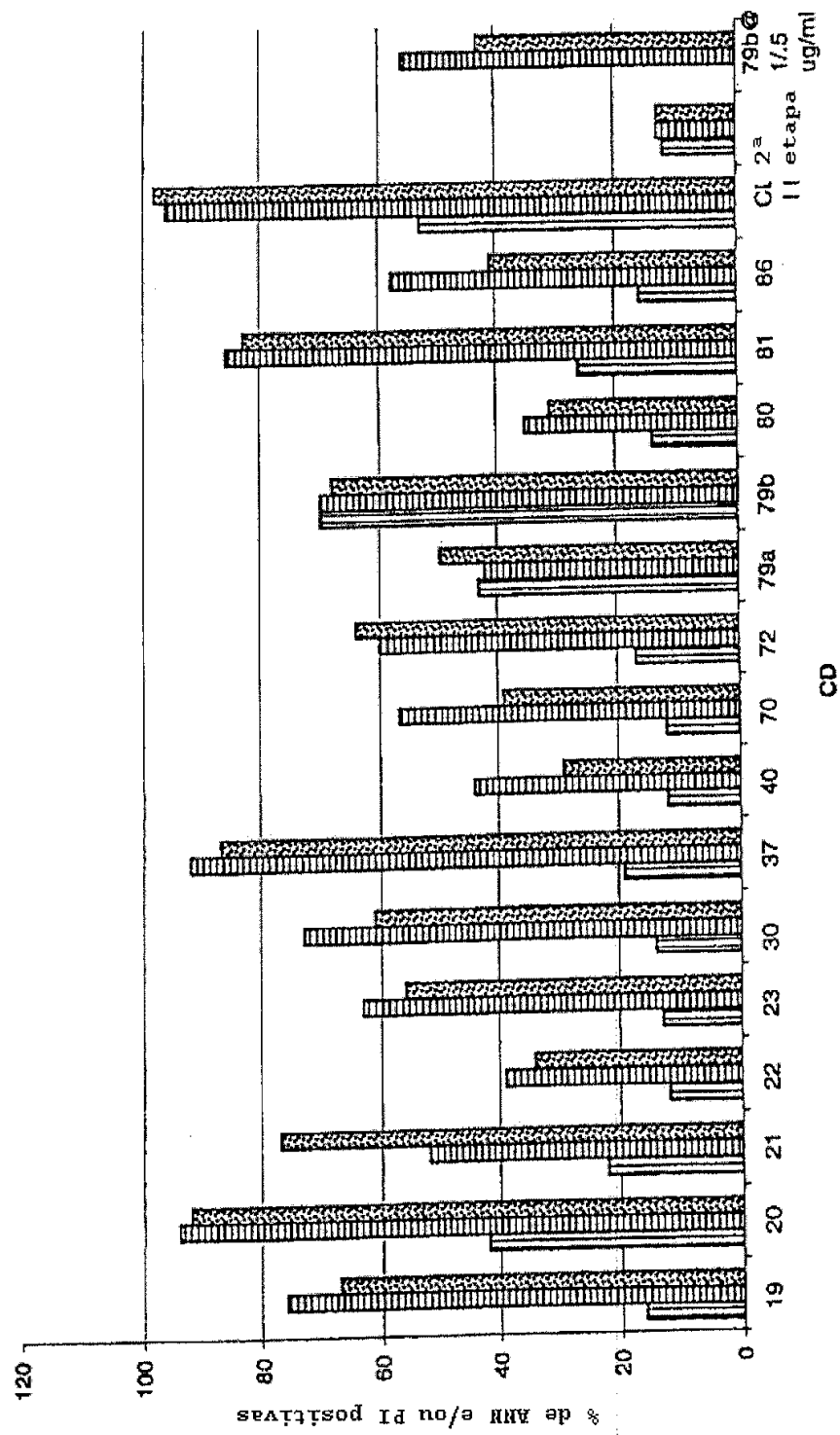


FIG. 22

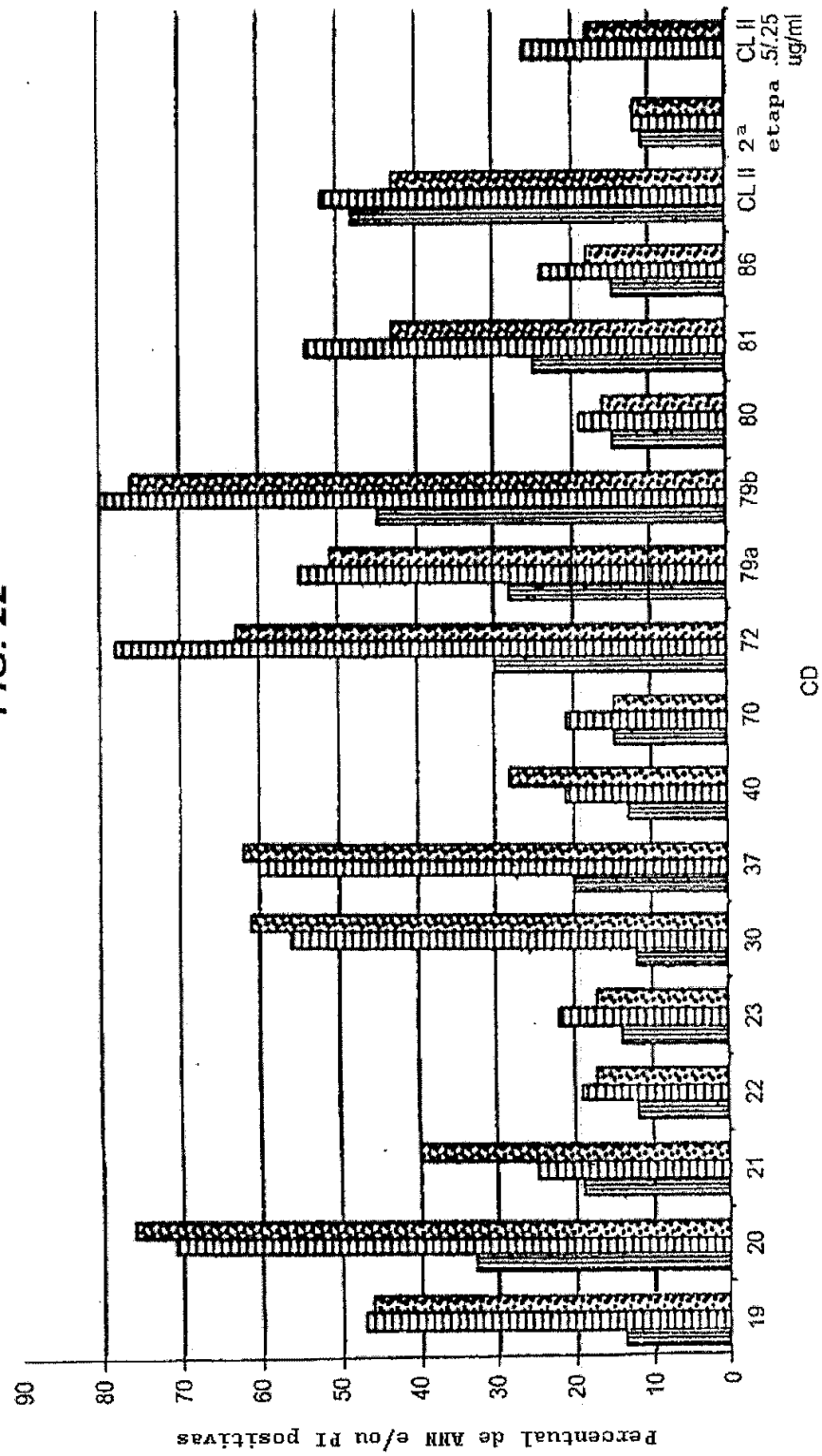


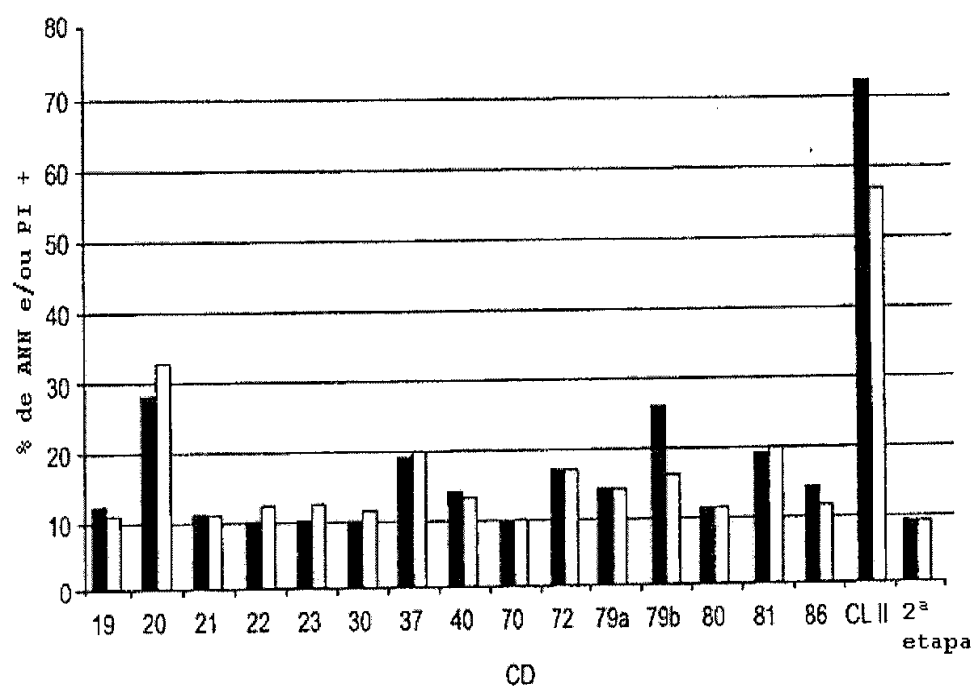
FIG. 23

FIG. 24

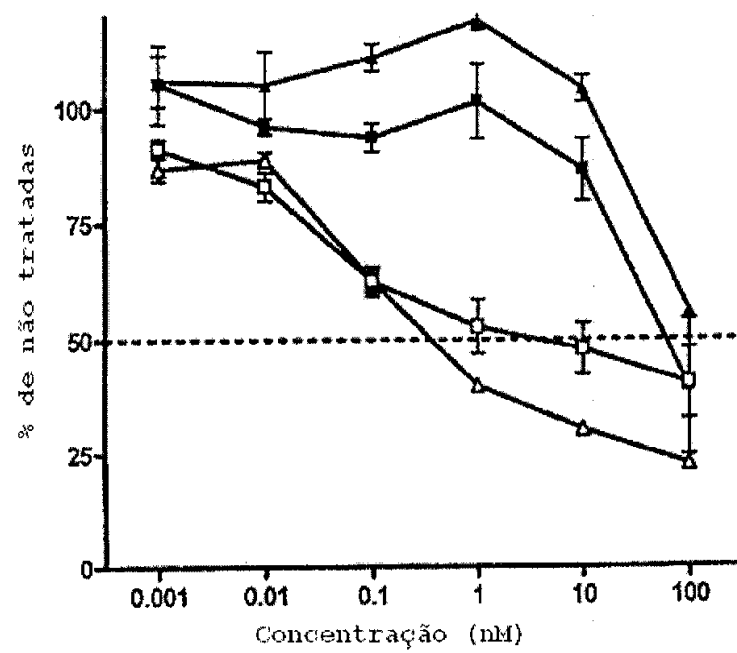


FIG. 25

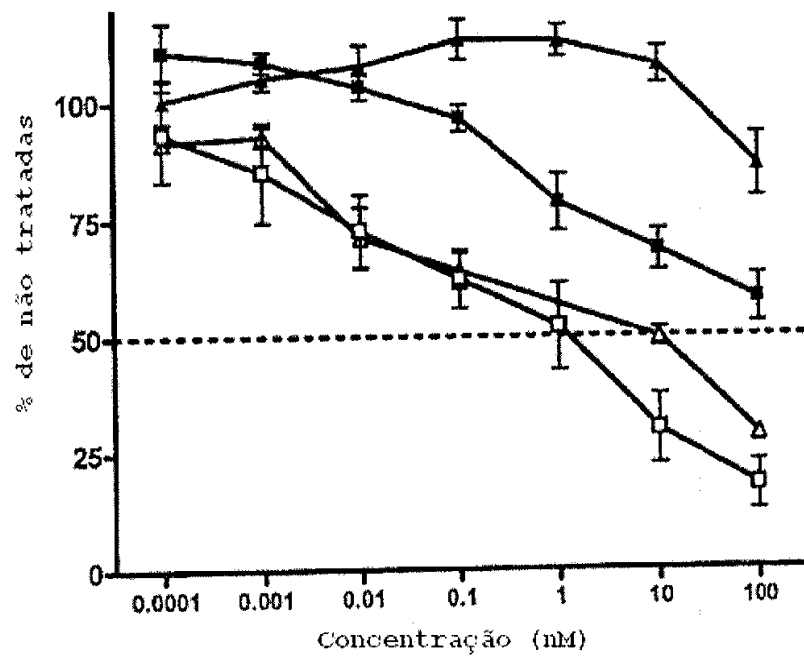


FIG. 26

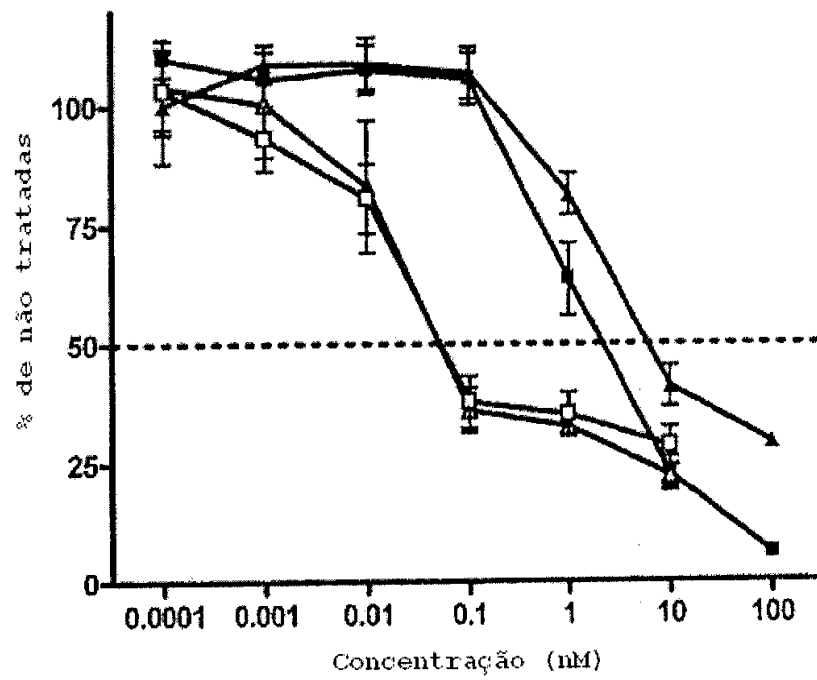


FIG. 27

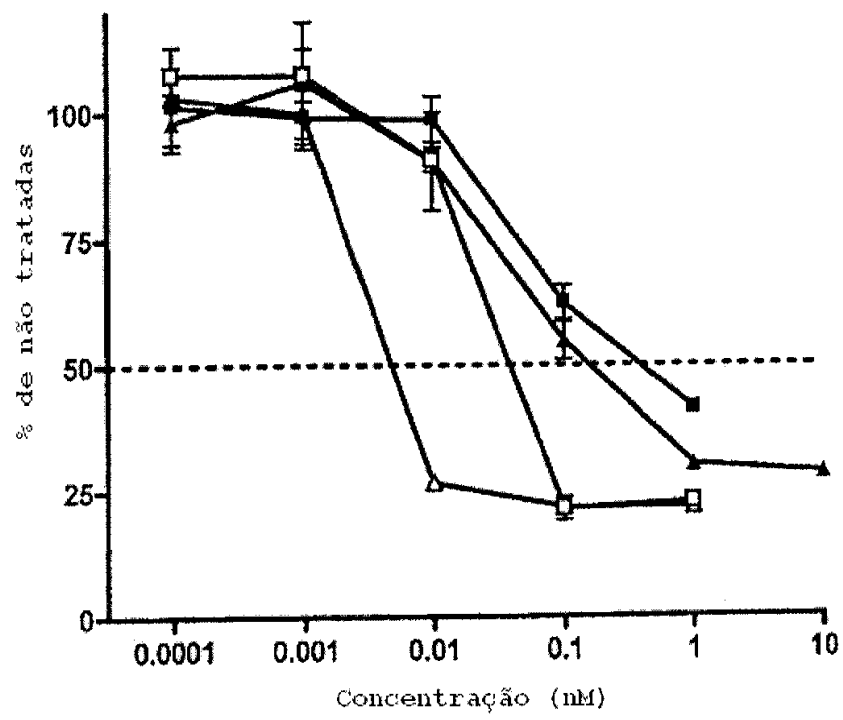


FIG. 28

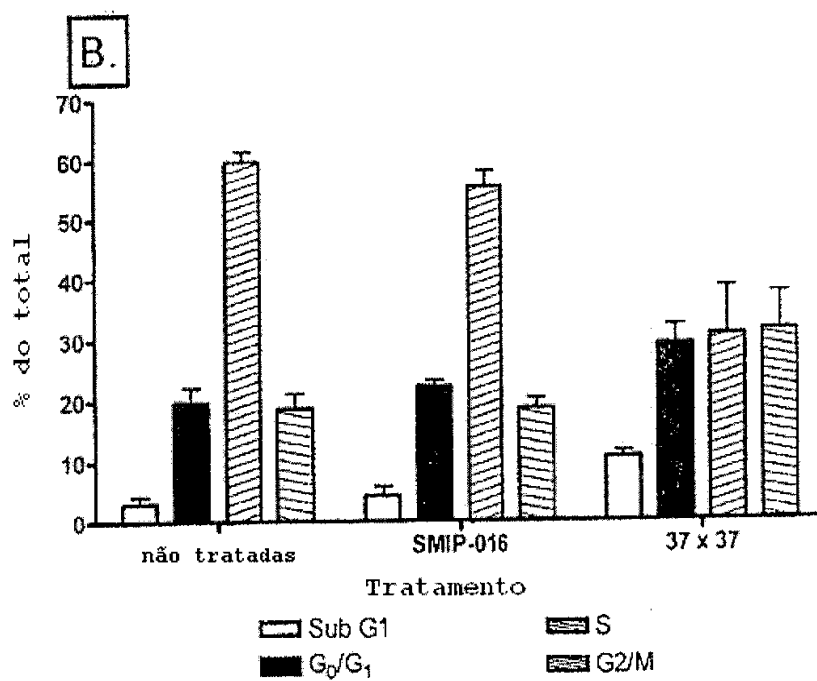
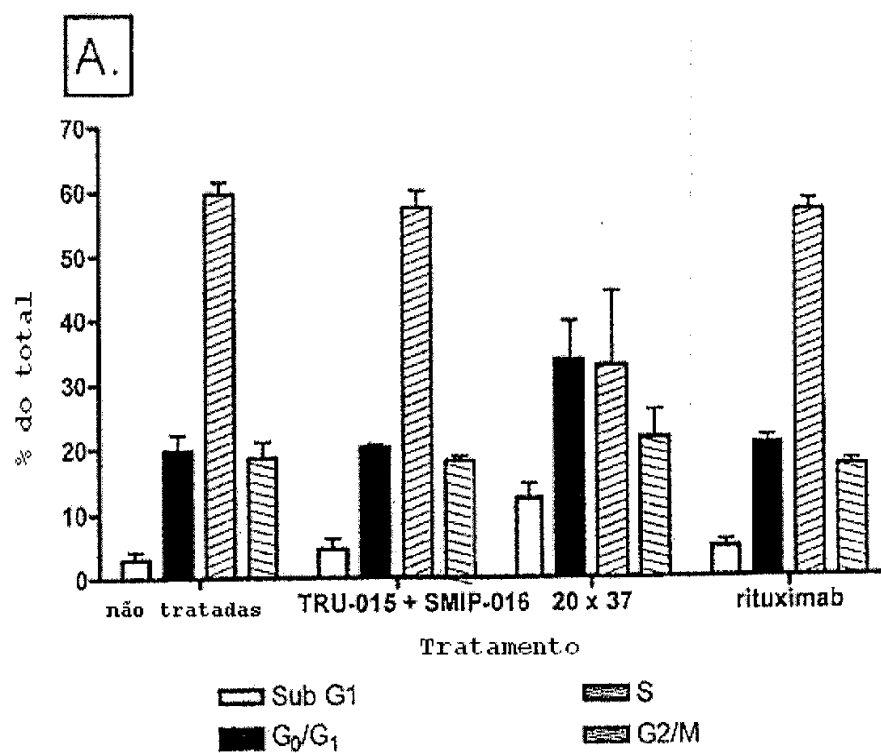


FIG. 29

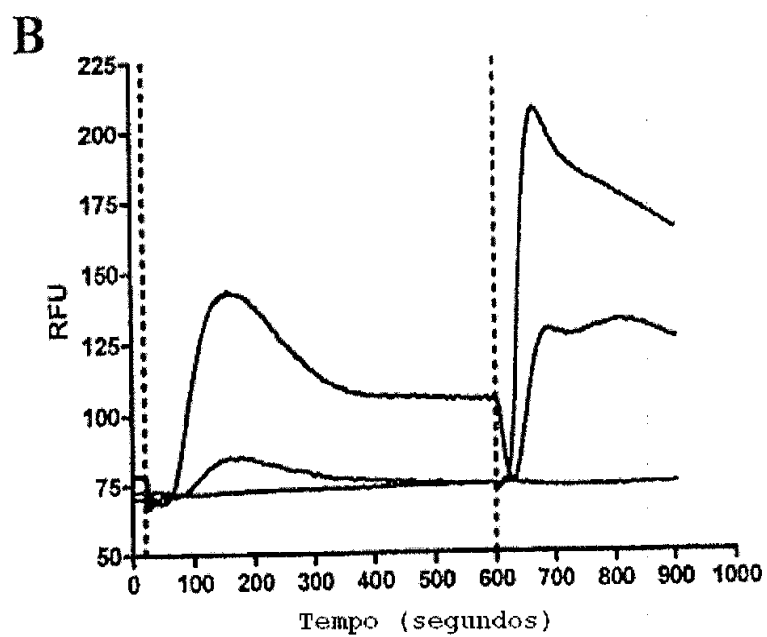
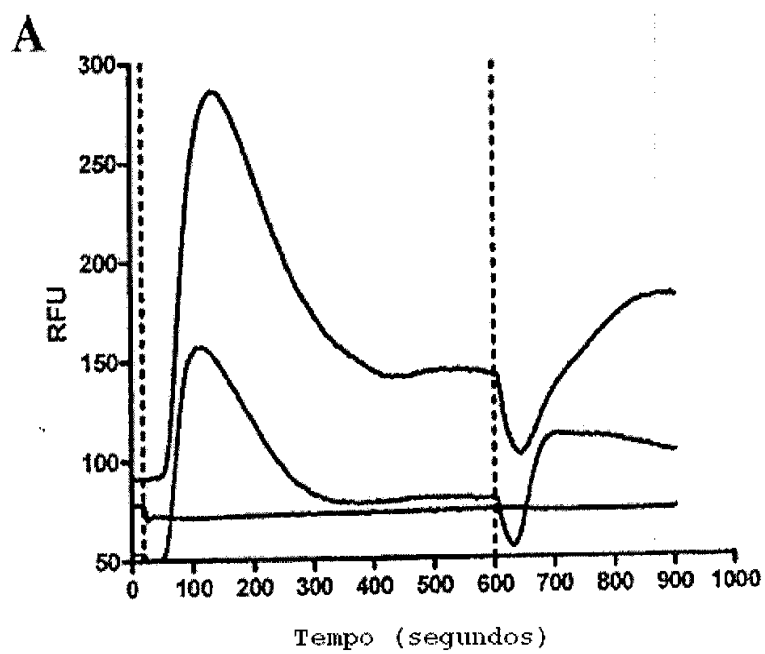


FIG. 30

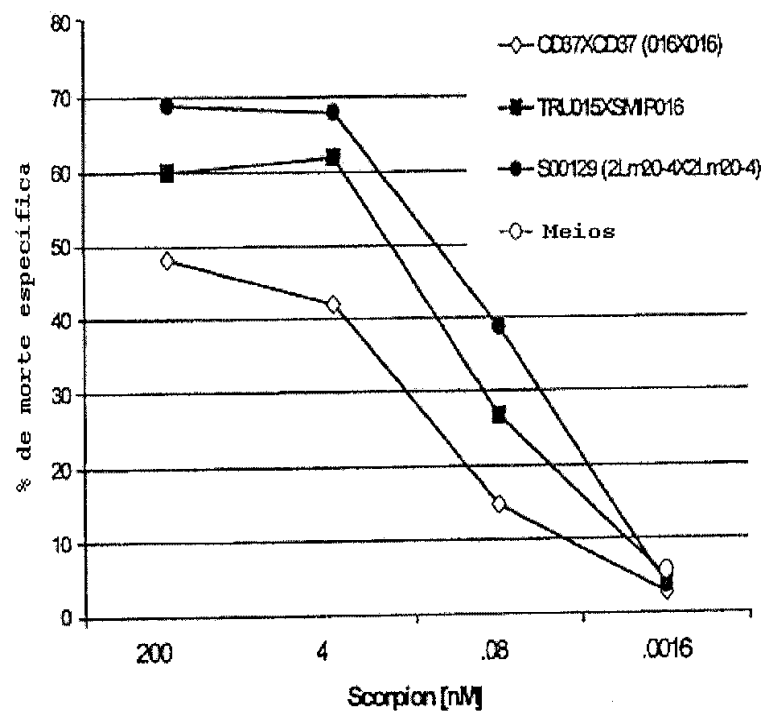


FIG. 31

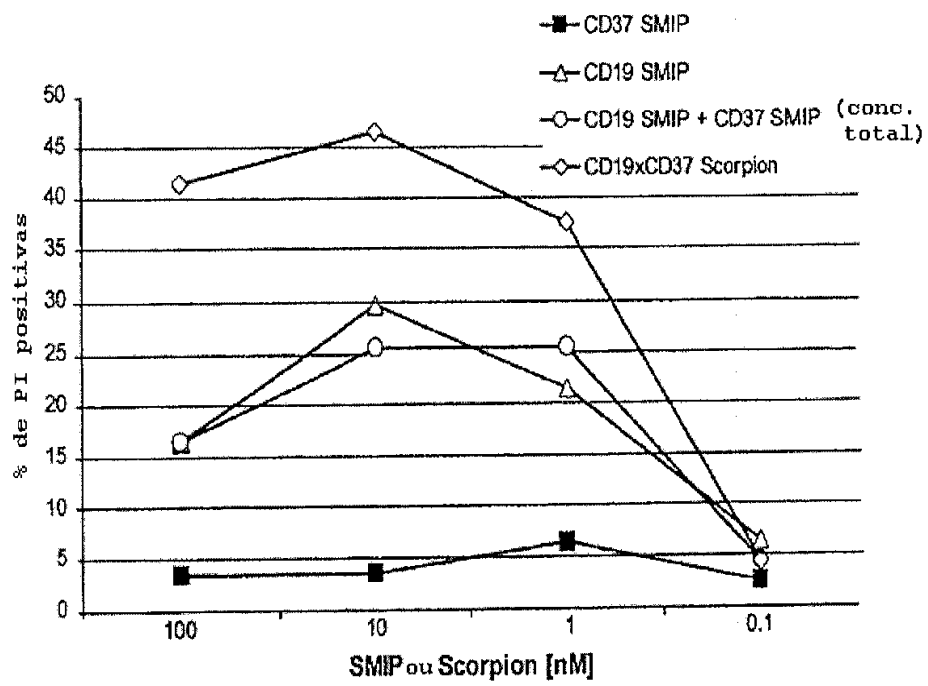


FIG. 32A

ELISA DE LIGAÇÃO DE CD16 (ALTA)

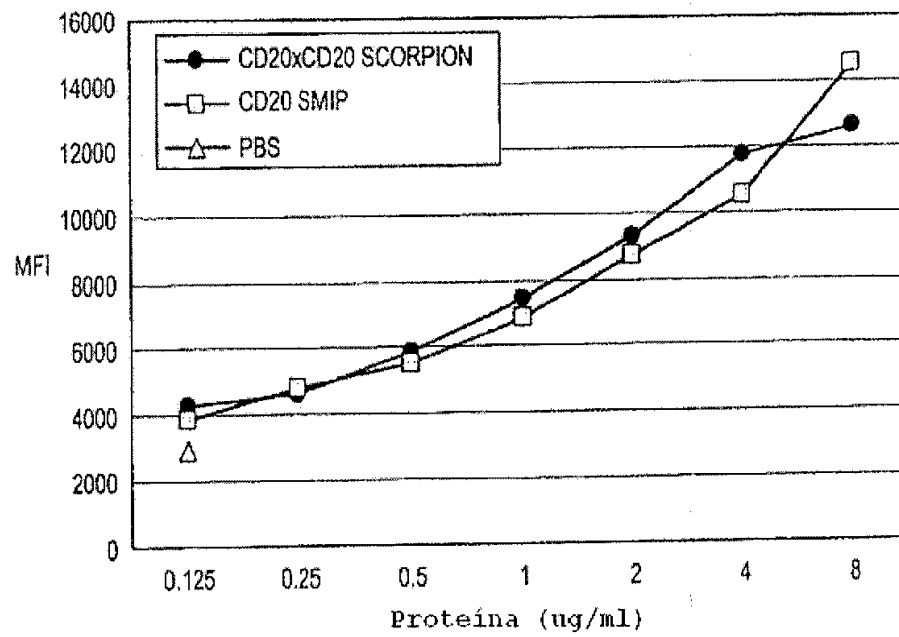


FIG. 32B

ELISA DE LIGAÇÃO DE CD16 (baixa)

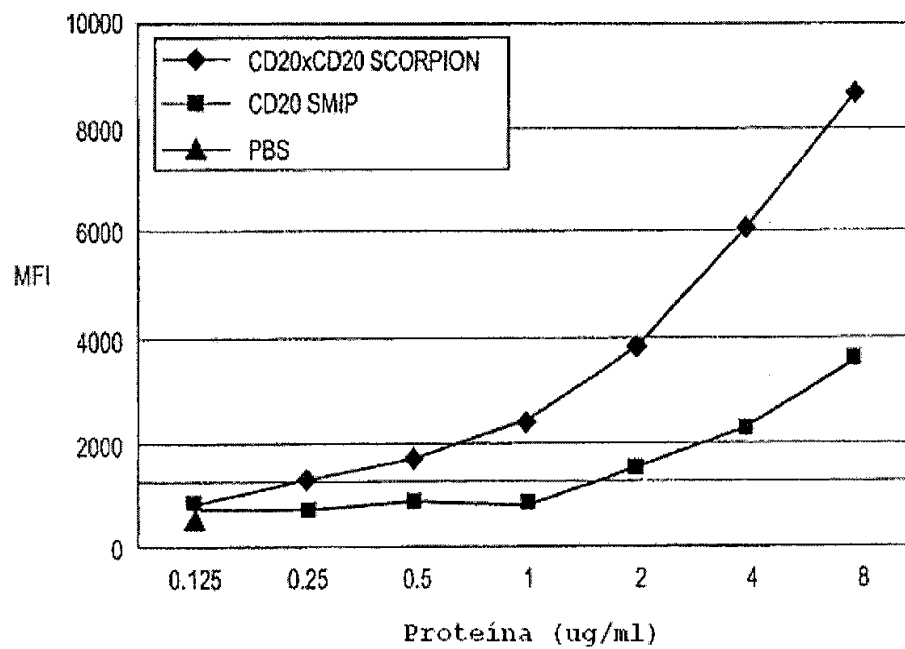
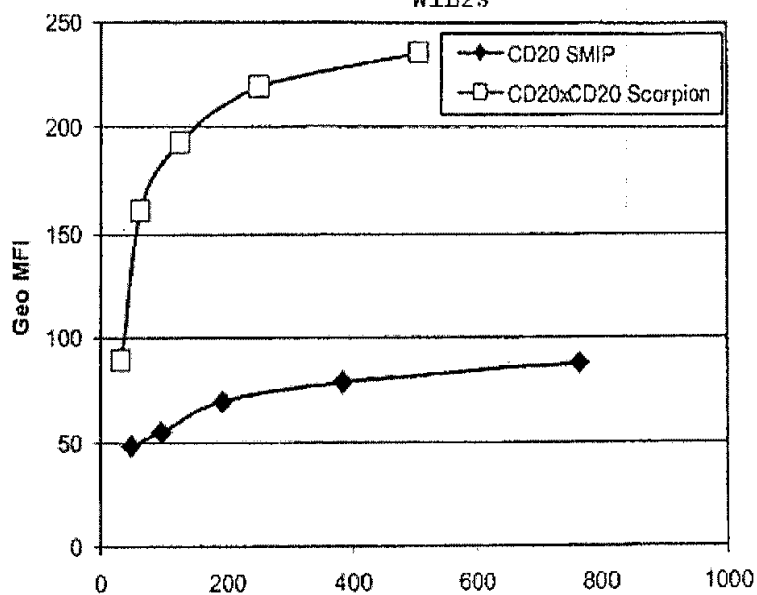


FIG. 33

Ligação de CD16 Lo ao SMIP/Scorpion ligado às
WIL2S



Ligação de CD16 Hi ao SMIP/Scorpion ligado às
WIL2S

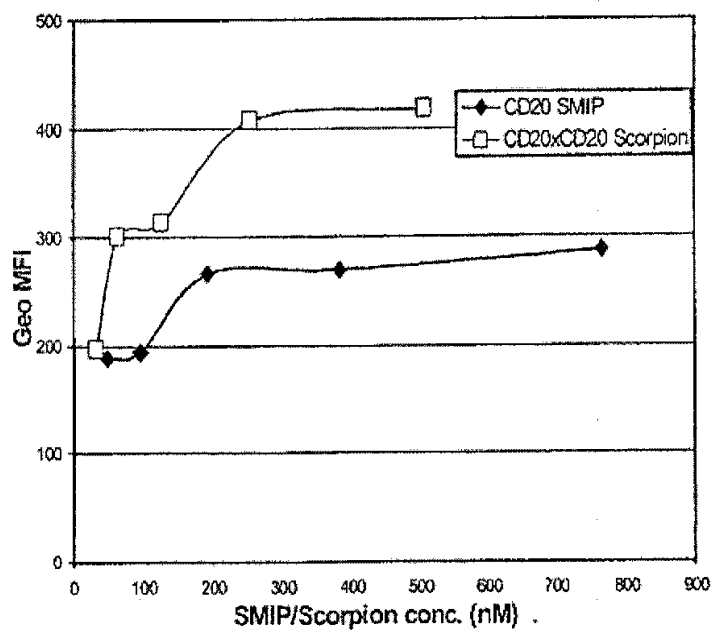


FIG. 34

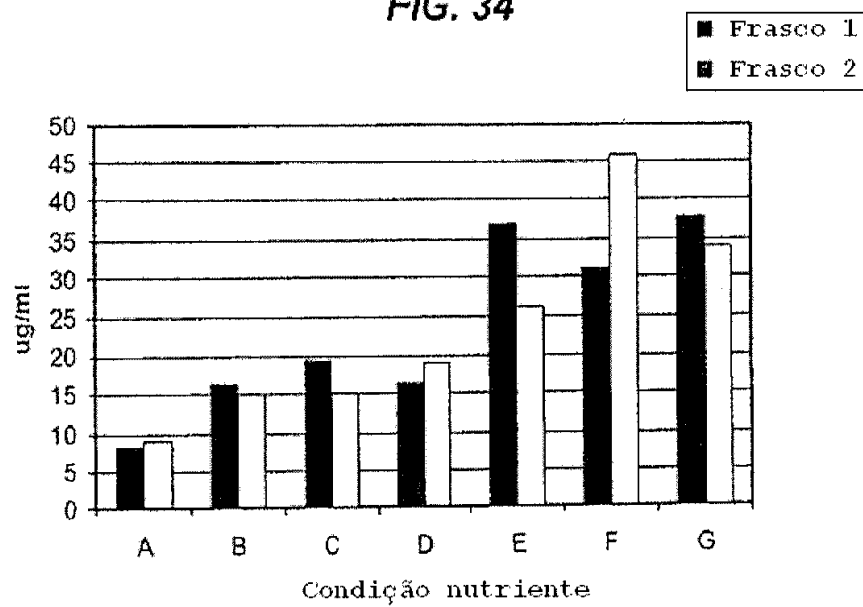


FIG. 35

Produção de Scorpion 20x37 em frascos em
agitação no 10° dia

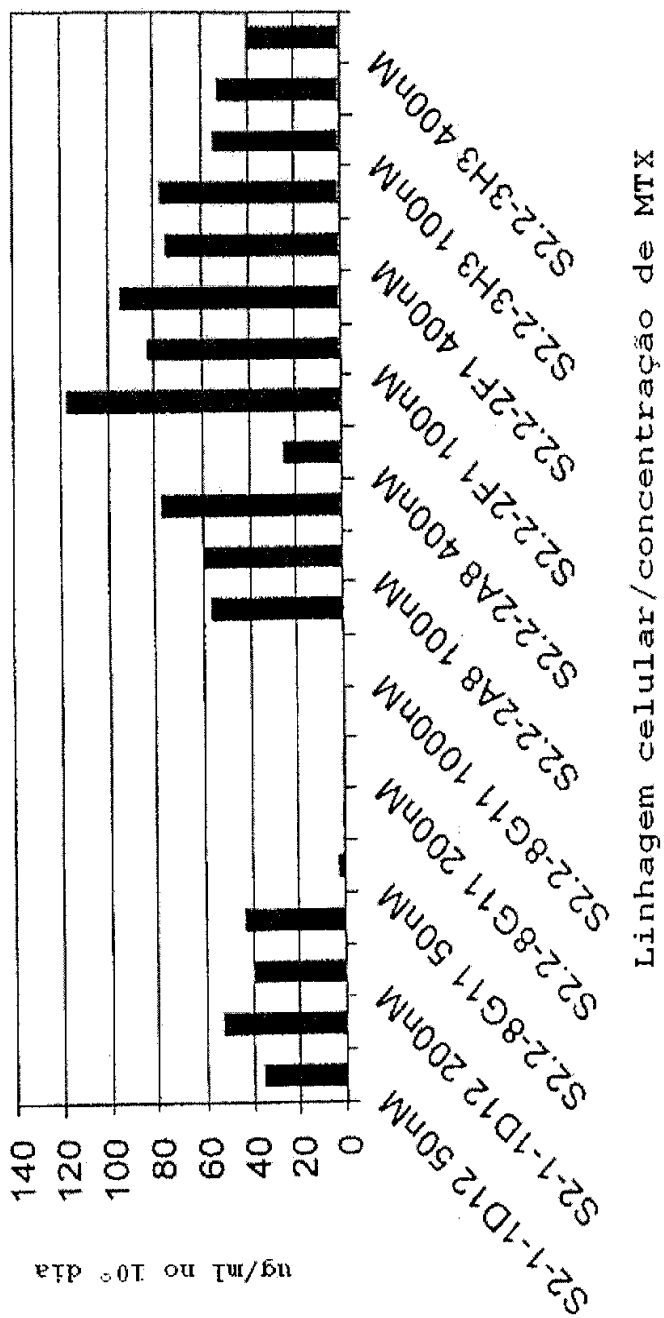


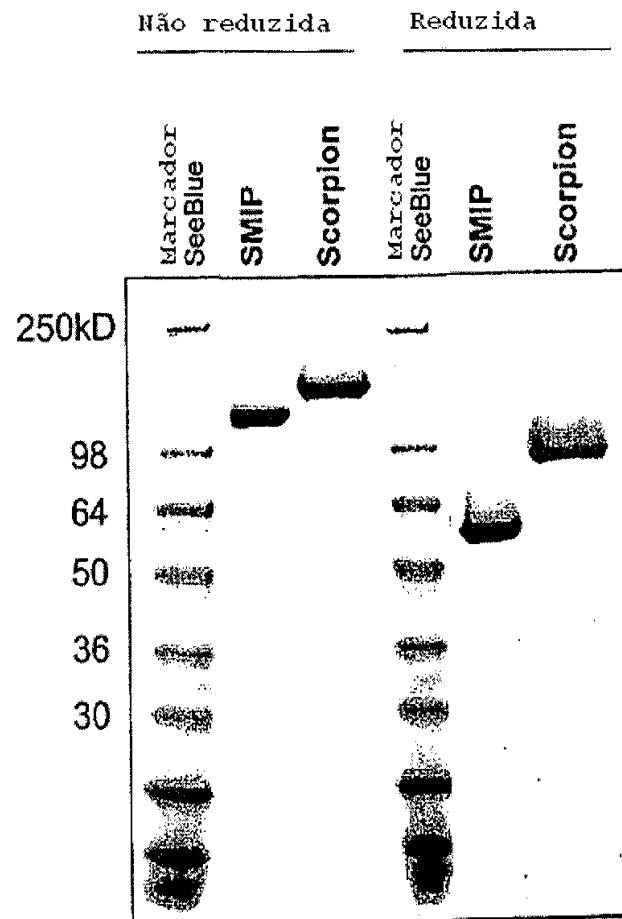
FIG. 36

FIG. 37

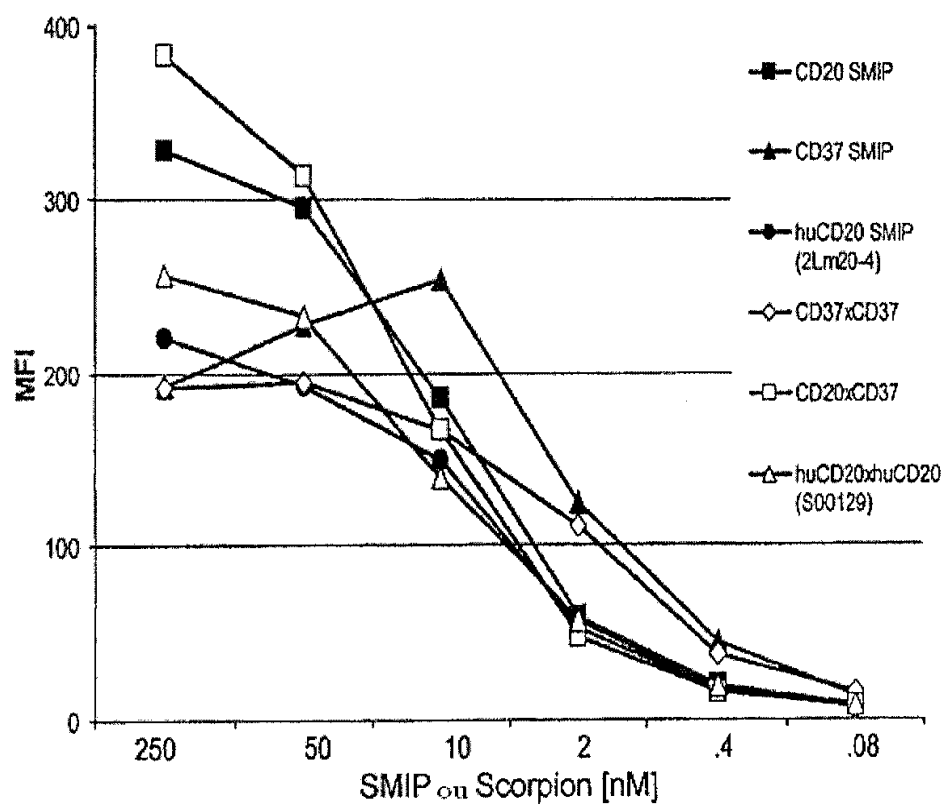


FIG. 38

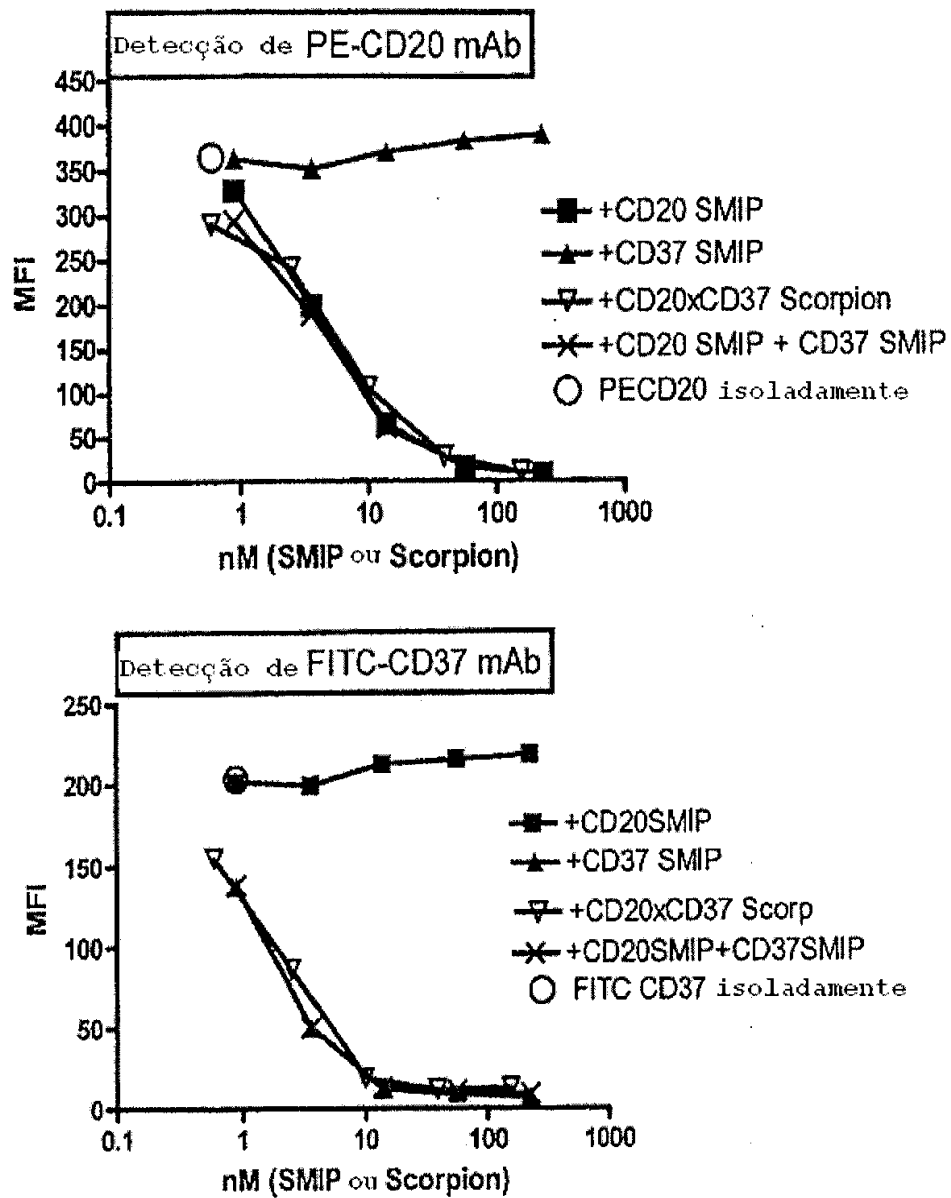


FIG. 39

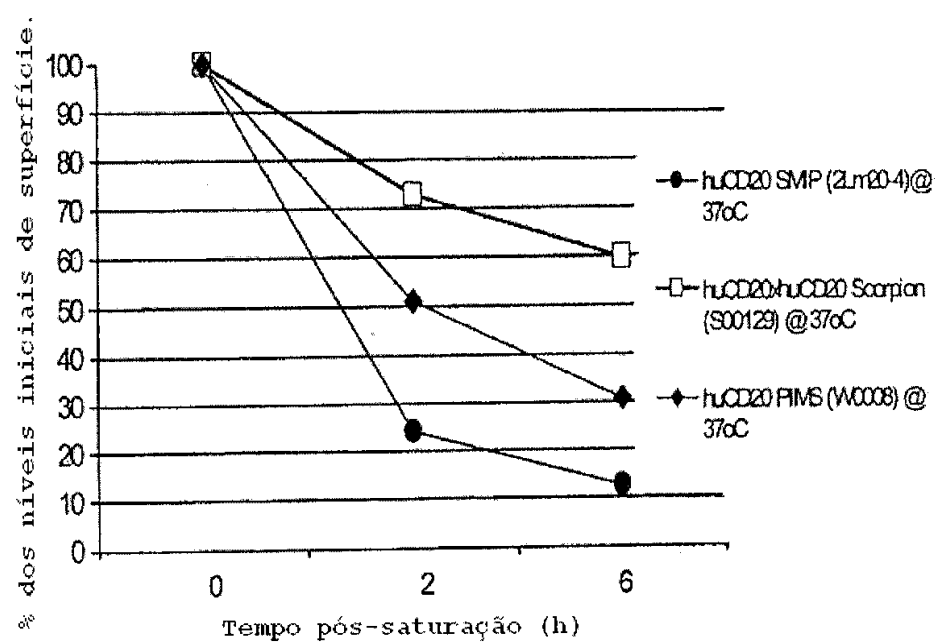


FIG. 40

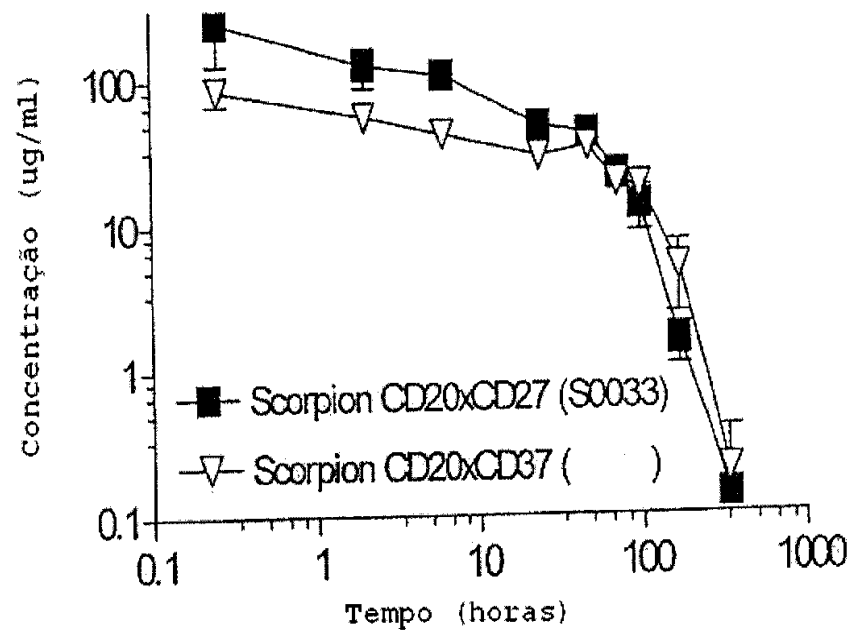


FIG. 41

% de sobrevivência
Resposta-dose de Scorpion 20x37 em um modelo de
xenoenxerto de Ramos (TRU.PC.0102)

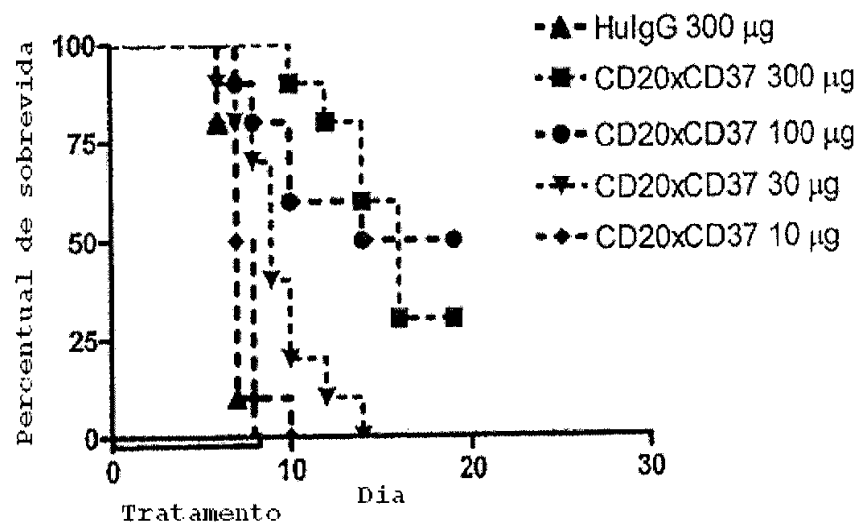
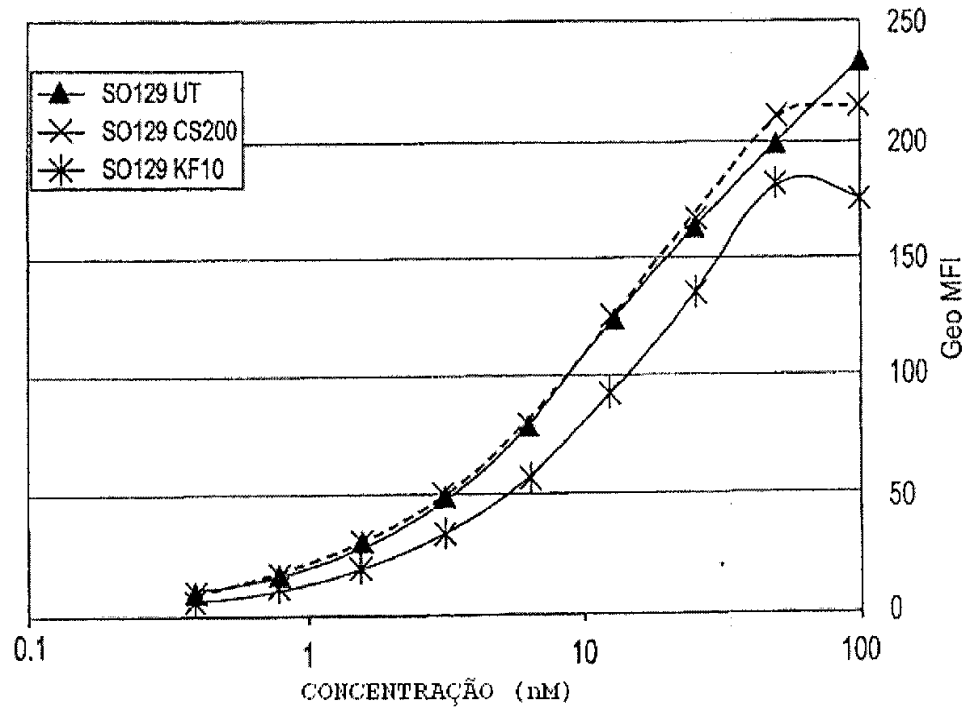


FIG. 42

Ligação de célula-alvo de S0129 parente e glicovariantes



Coloração de WIL2S com 2Im20-4 e S0129 +/- modificação de carboidrato

Kifunensina@10 μ M (excesso), Castanospermina@200 μ M

FIG. 43

Morte mediada por ADCC de células B BJAB por Scorpions
anti-CD20 e células efetoras homozigotas (CD16) de
baixa afinidade
12,5:1 efetor:alvo

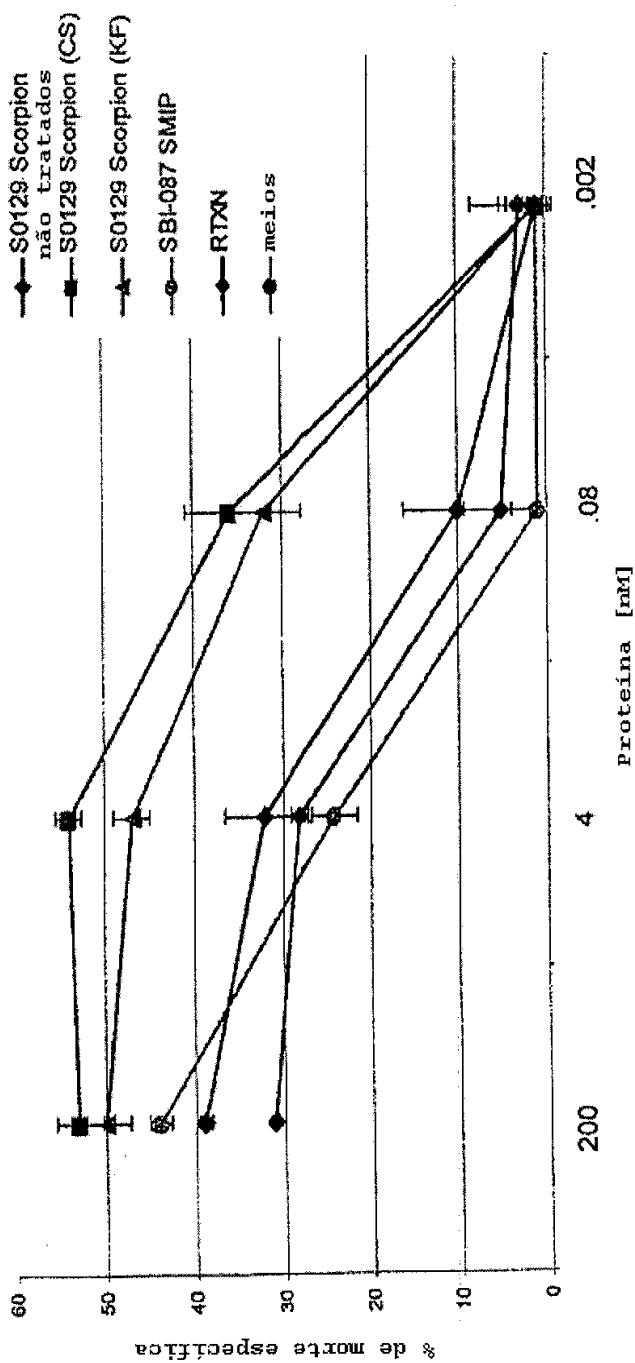


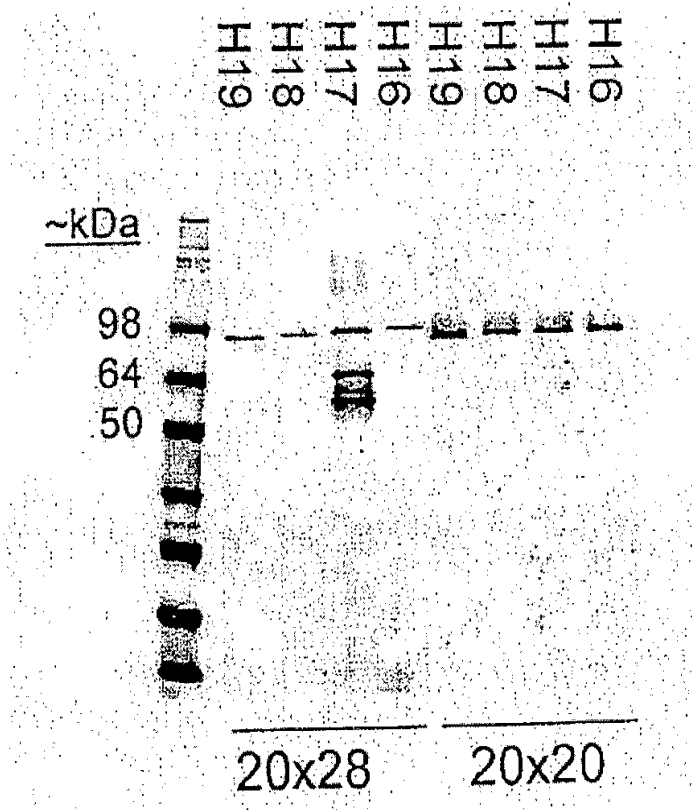
FIG. 44

FIG. 45

Ligação de WILS2 de variantes do vinculador scorpion

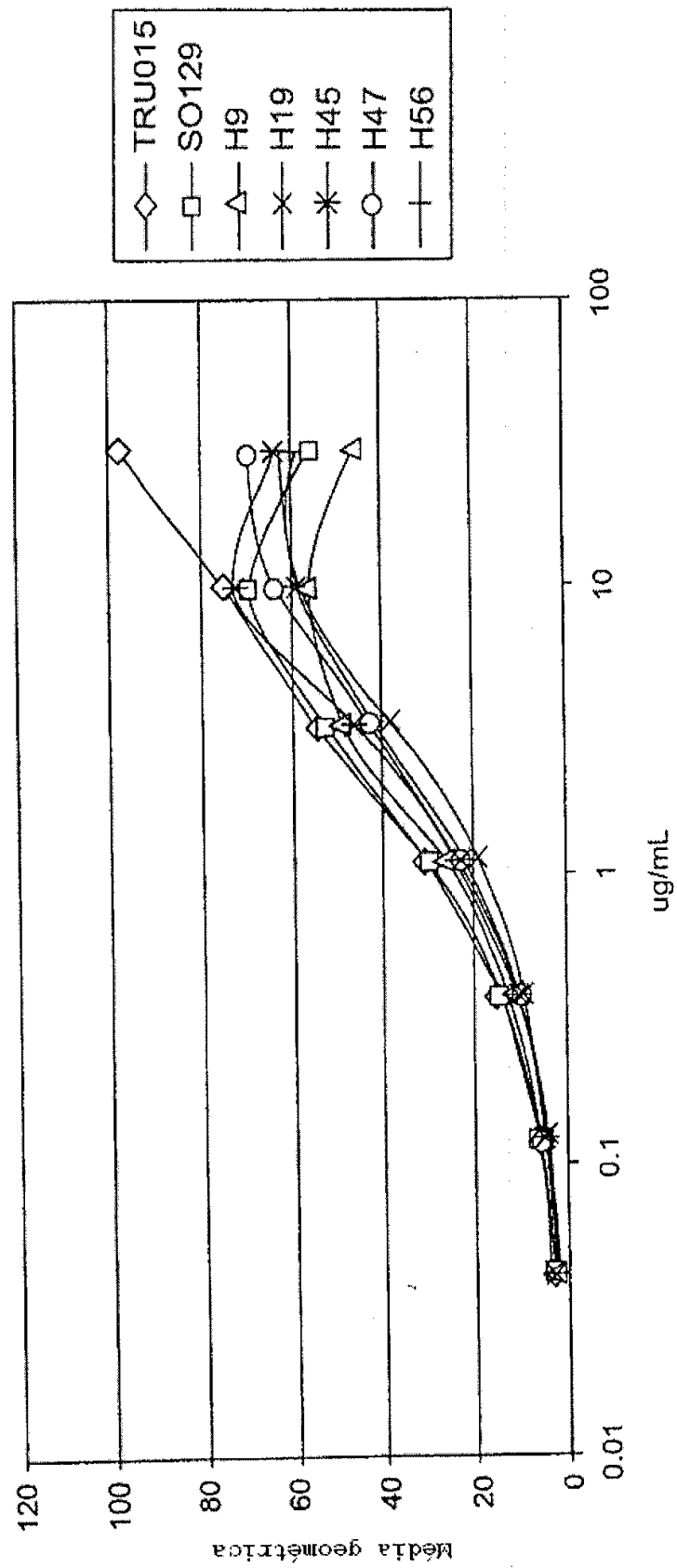


FIG. 46

Atividade de Scorpion 20x20 (fechados) vs SMIP (abertos)

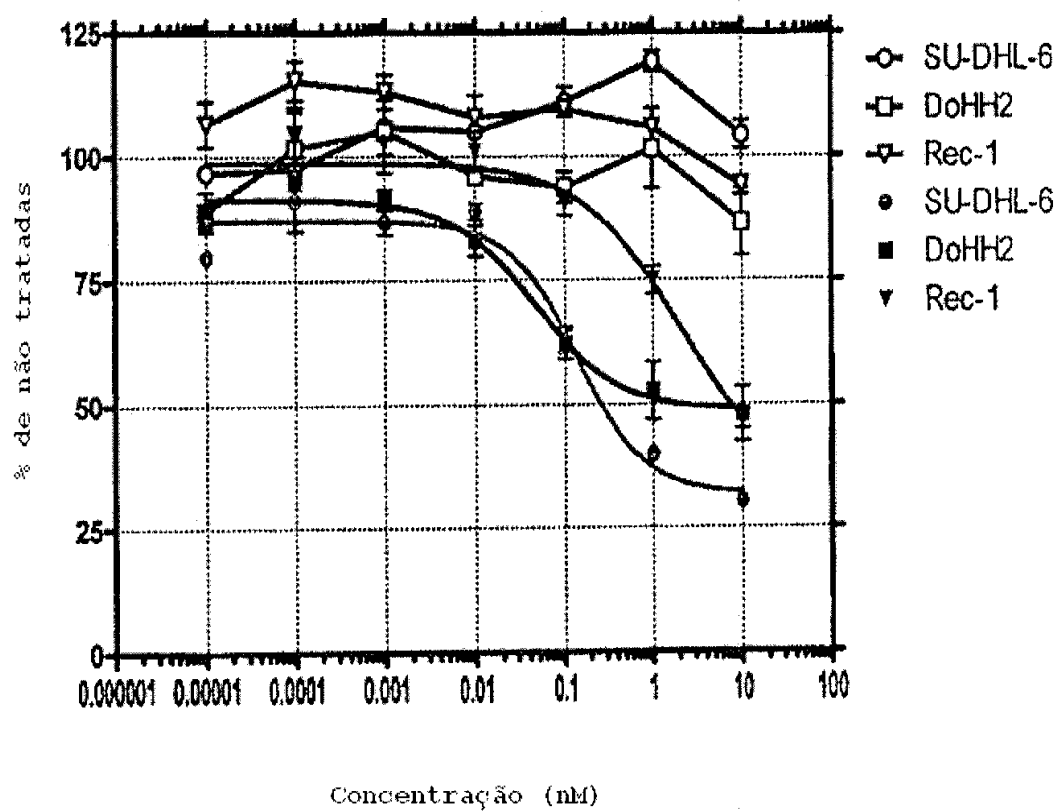


FIG. 47

Atividade de scorpion 20x20 vs linhagens de células NHL

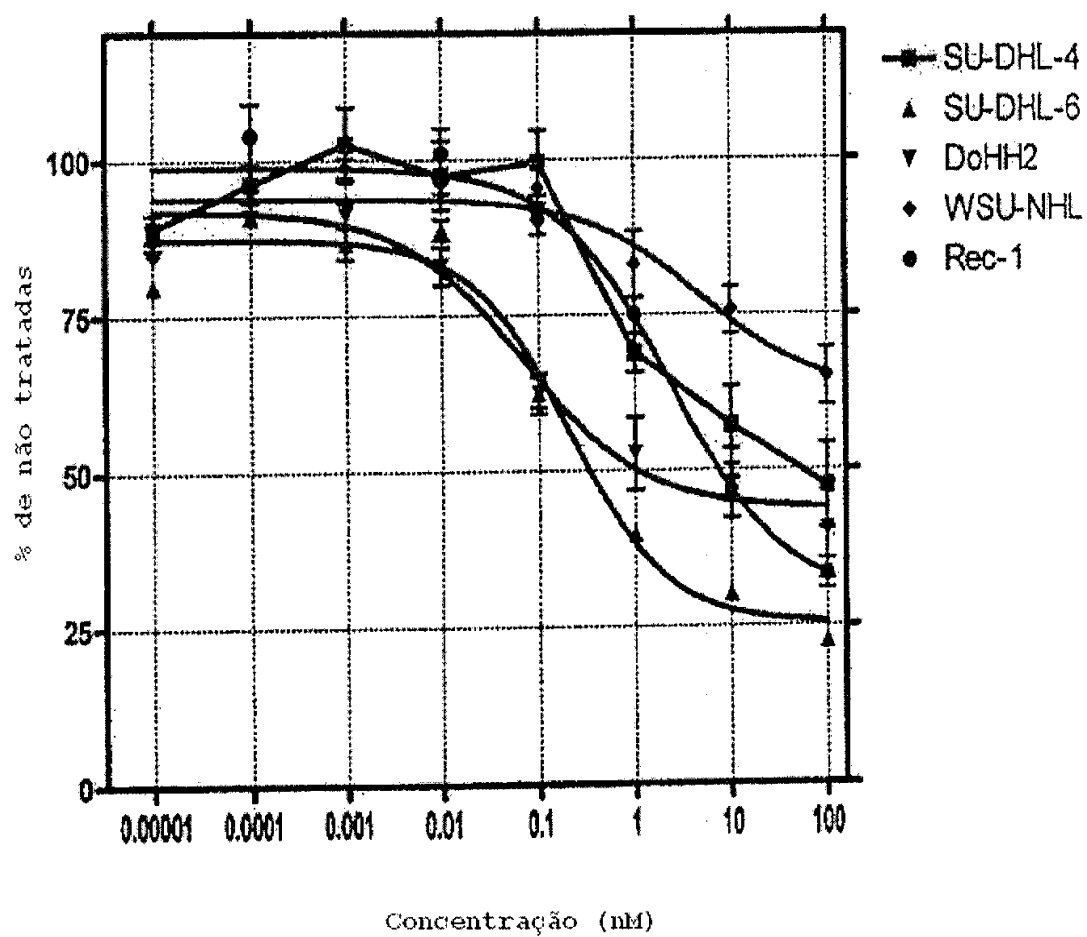


FIG. 48

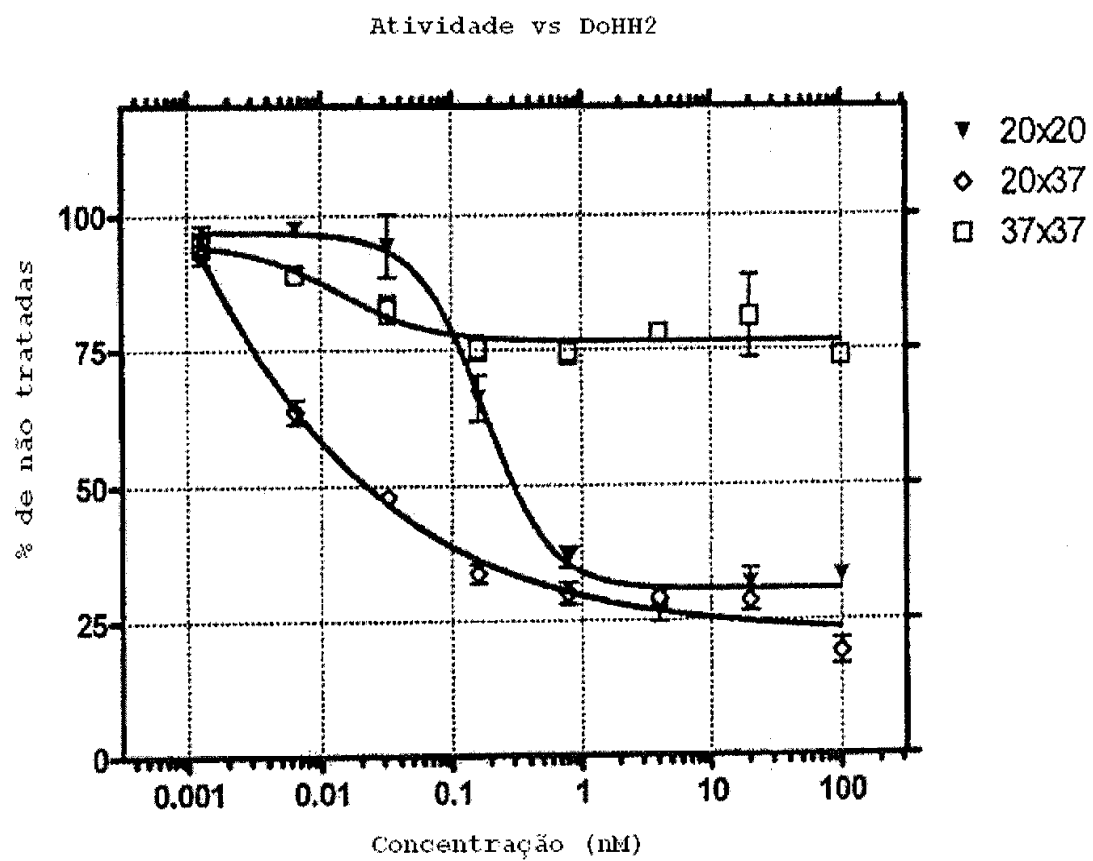


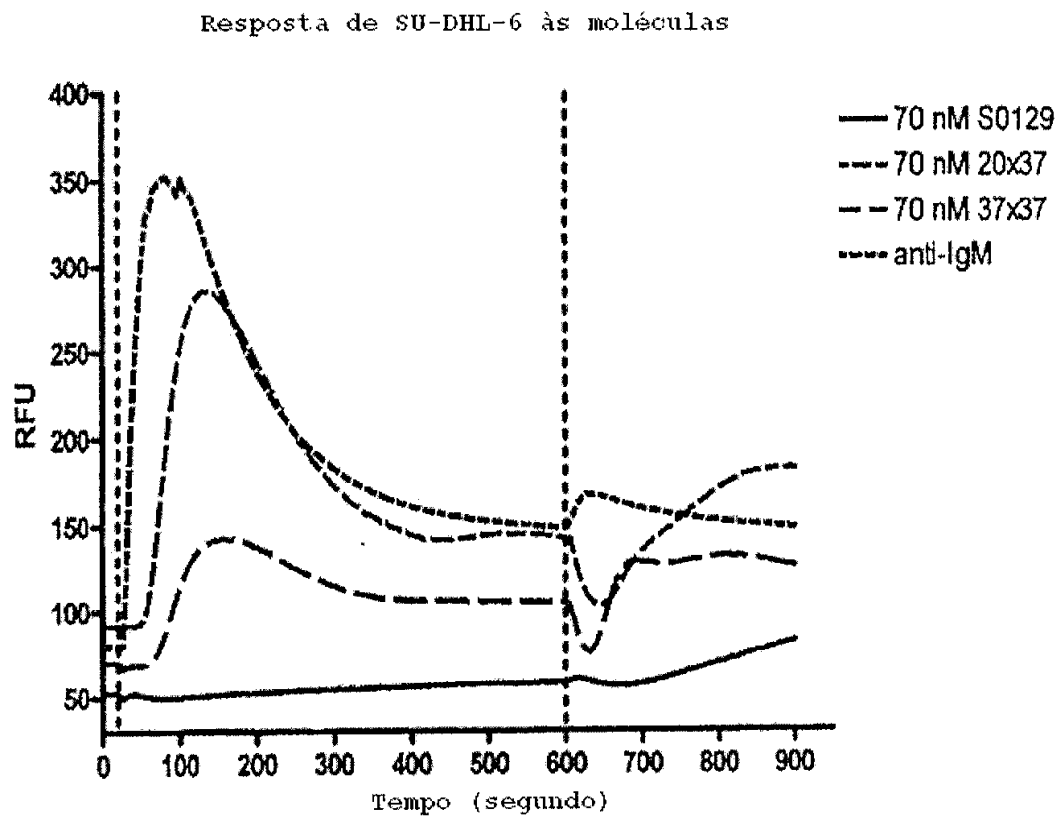
FIG. 49

FIG. 50

Atividade vs SU-DHL-6

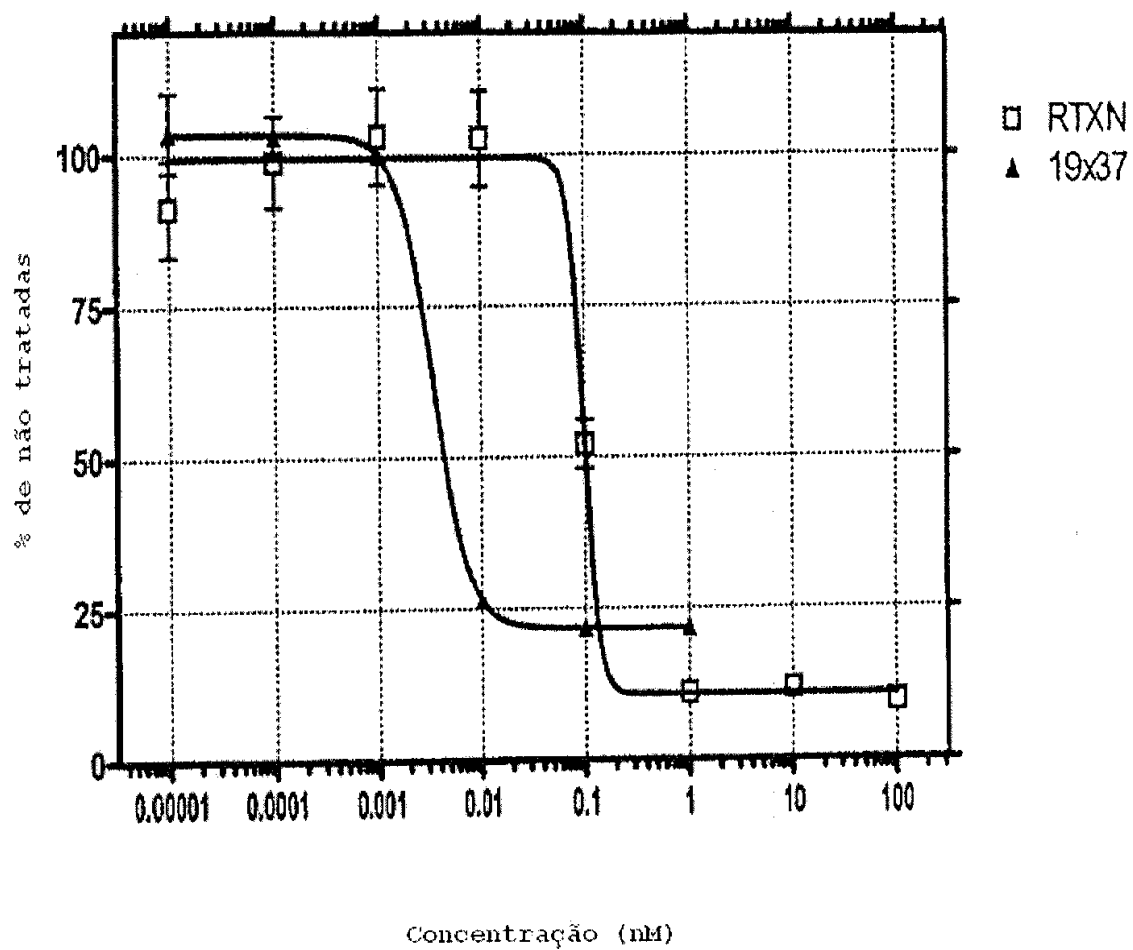


FIG. 51

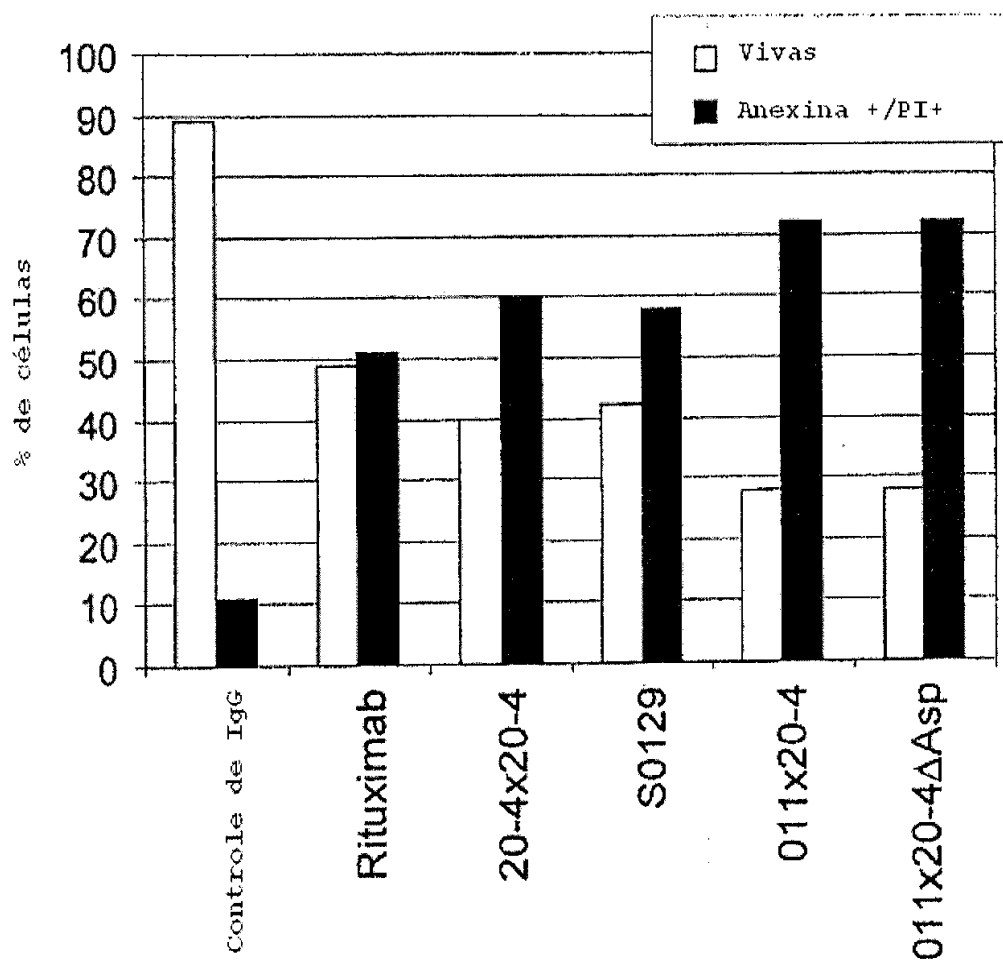


FIG. 52

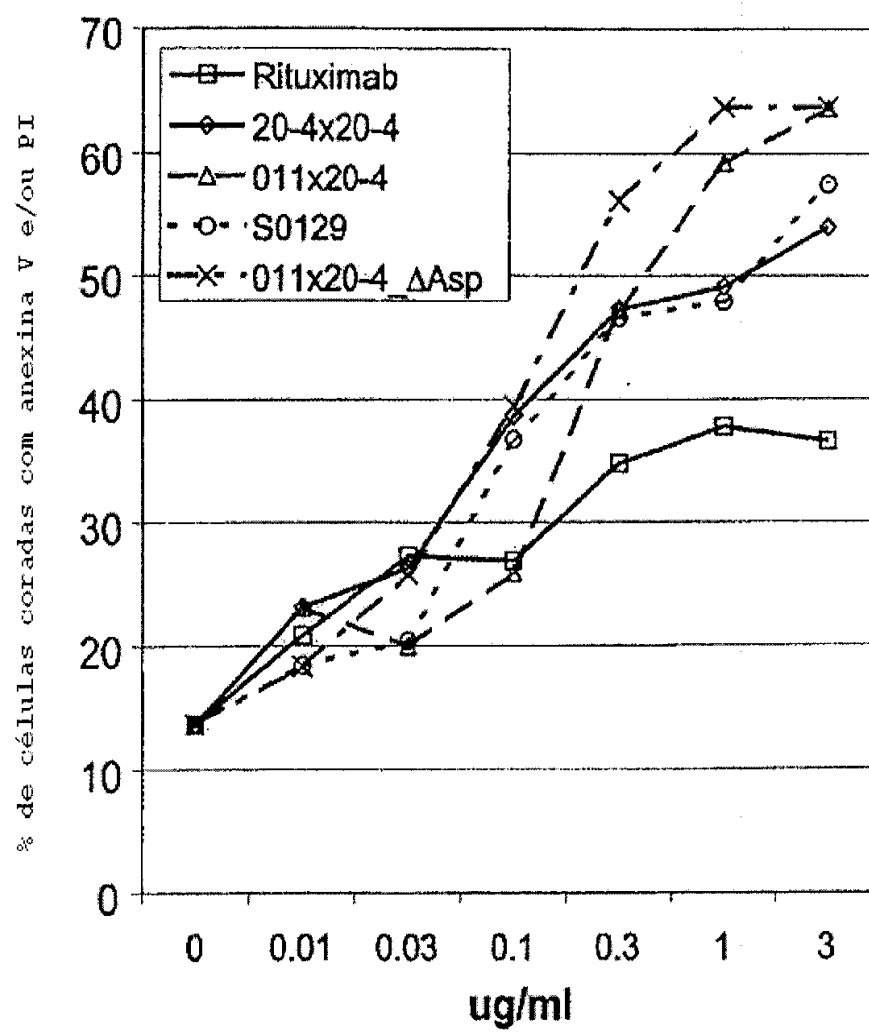


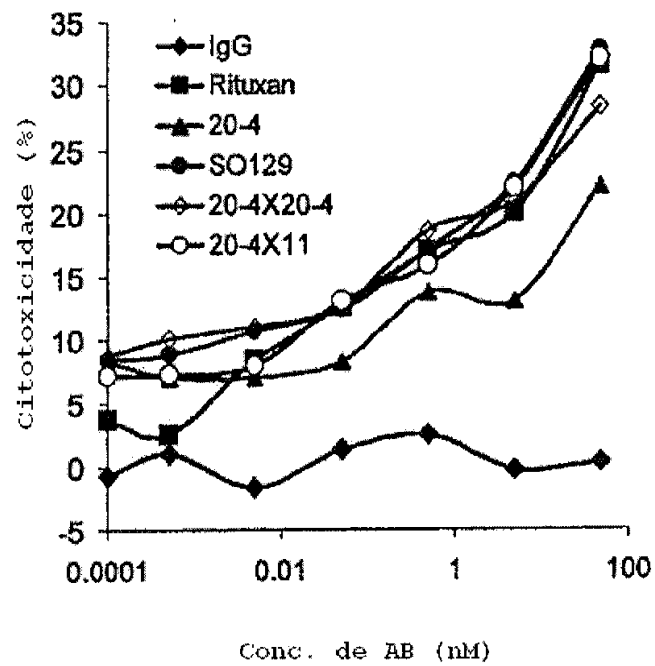
FIG. 53

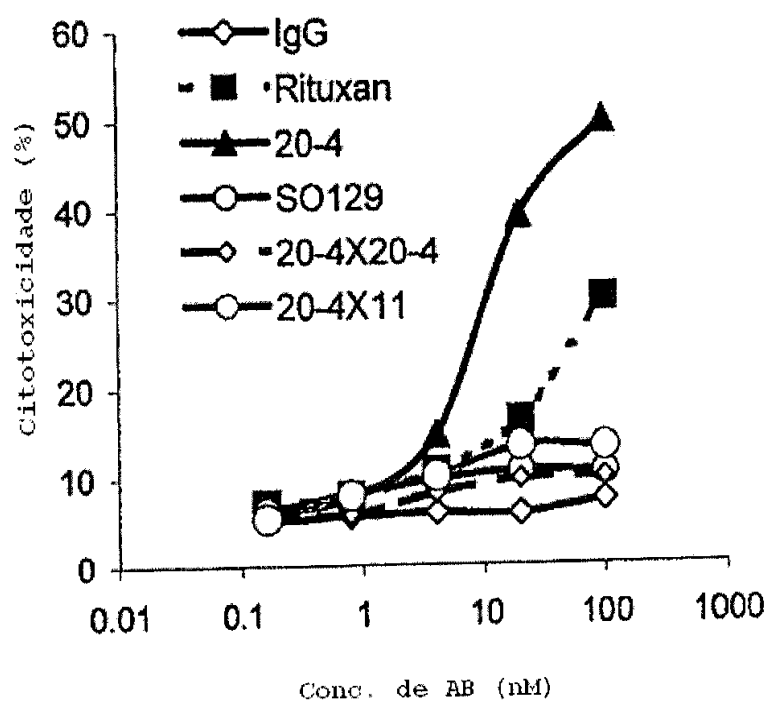
FIG. 54

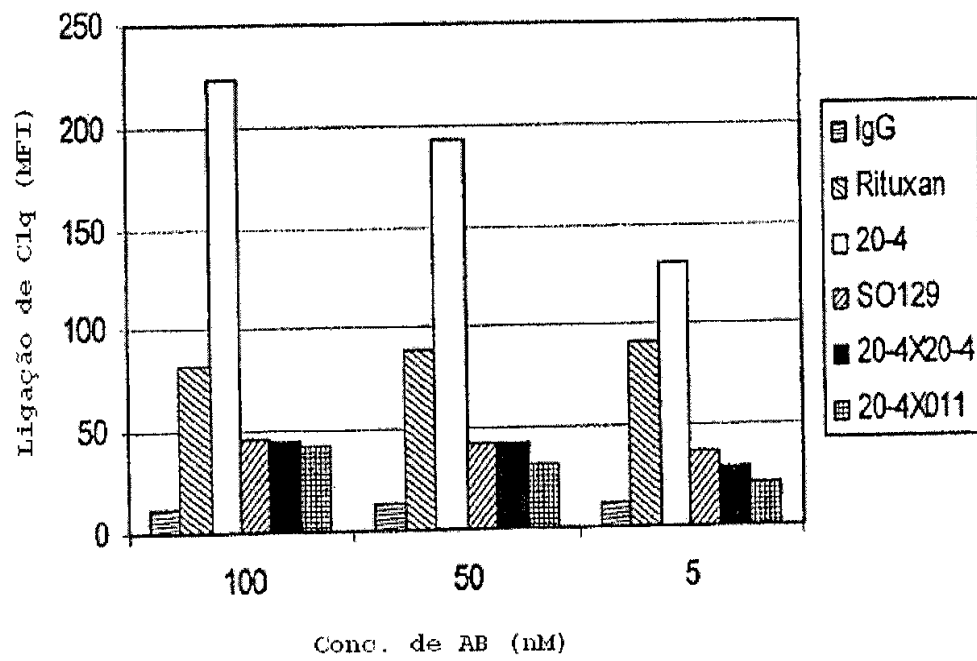
FIG. 55

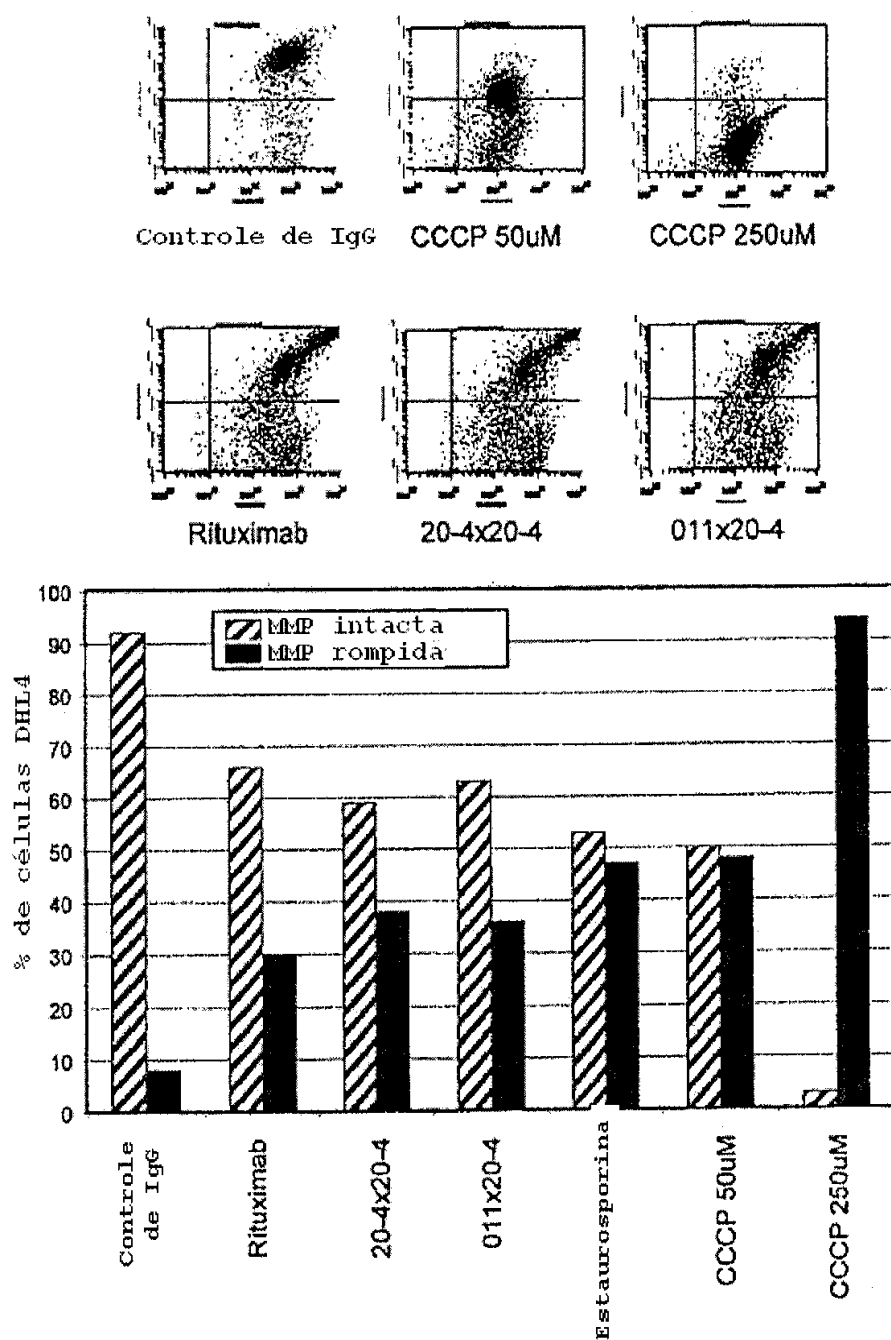
FIG. 56

FIG. 57

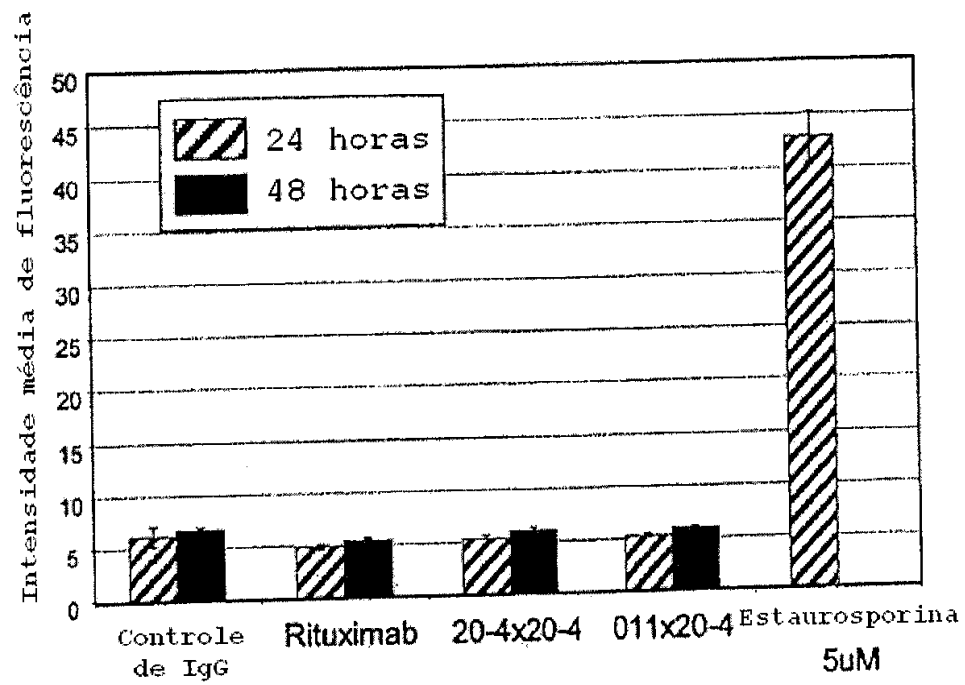


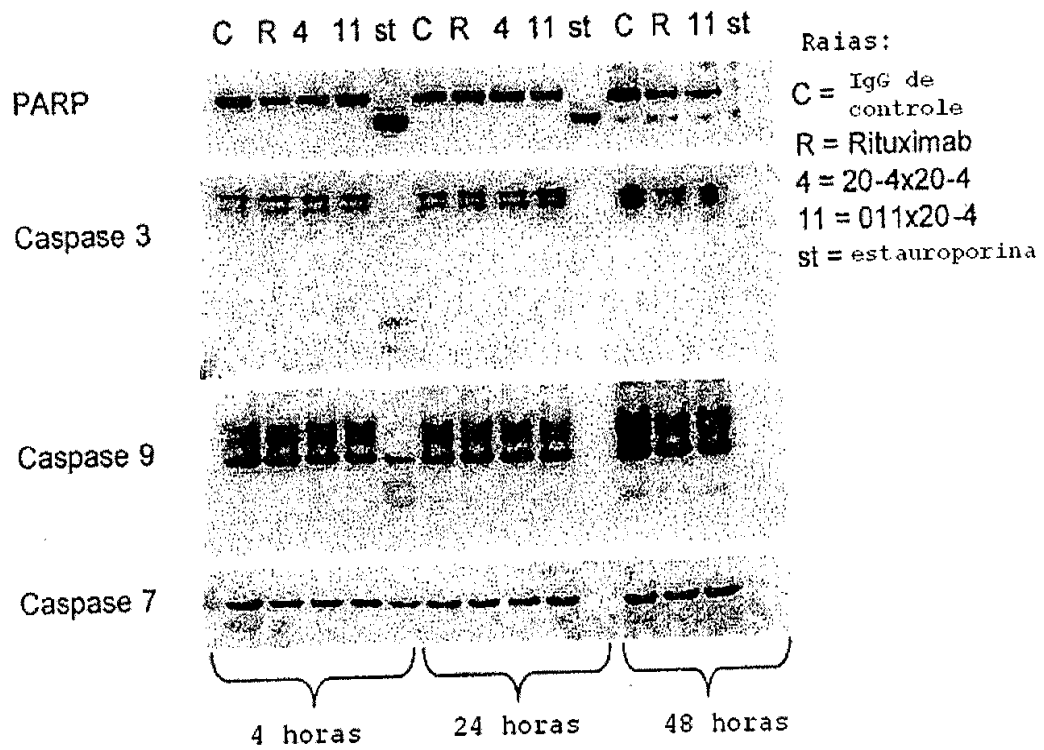
FIG. 58

FIG. 59

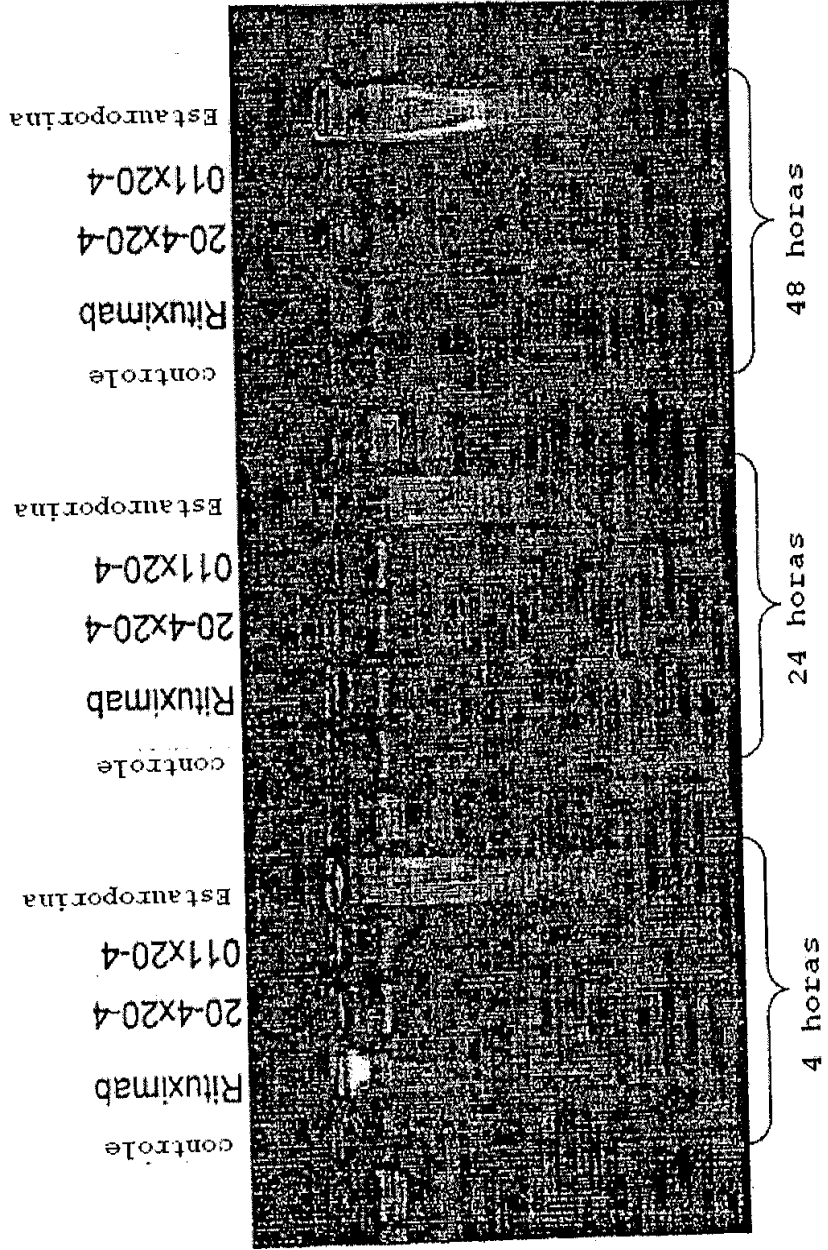
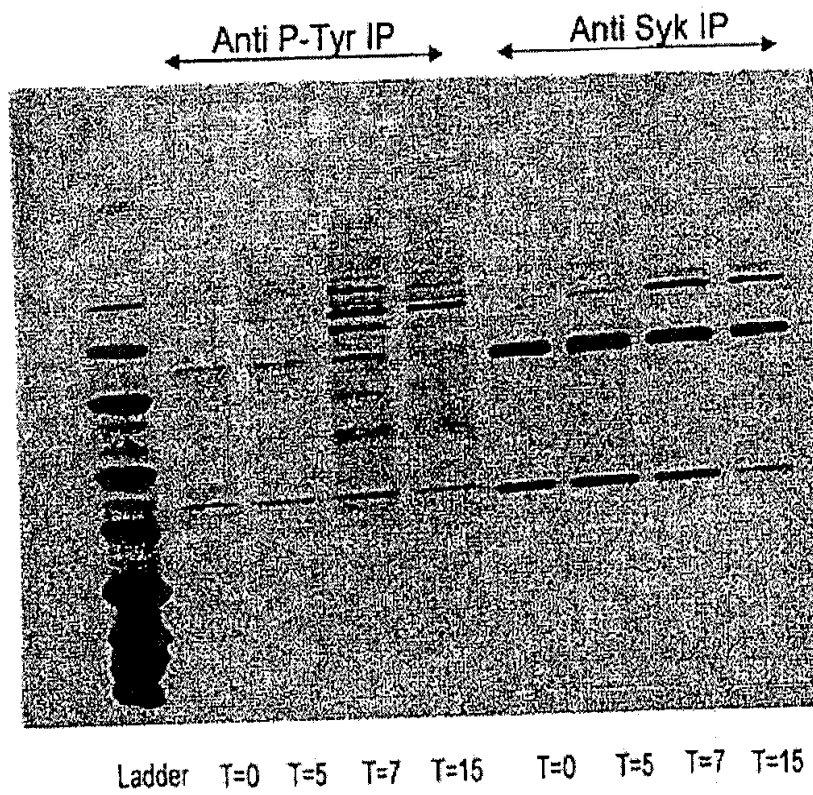
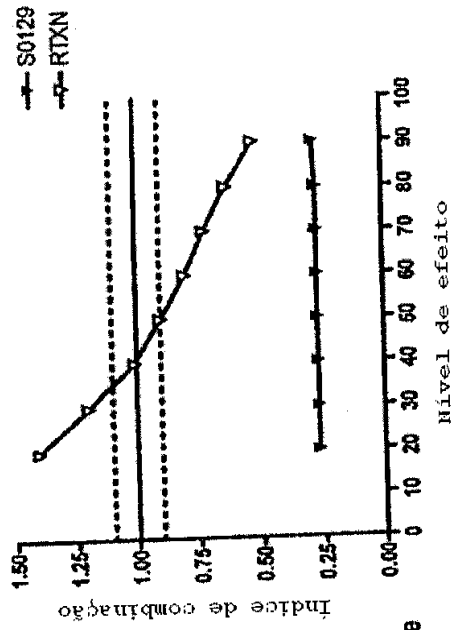


FIG. 60

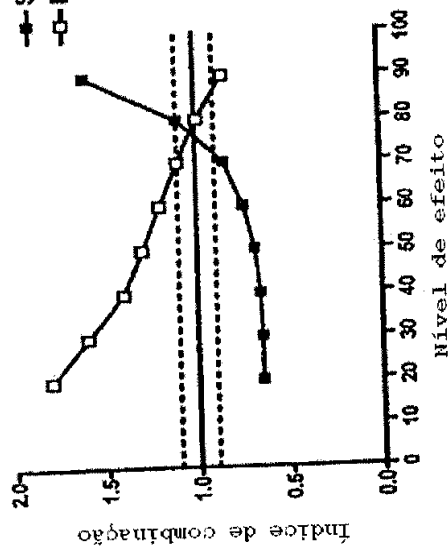
células DHL6 tratadas com Scorpion 20x37



Combo de 20x20 v RTXN com rapamicina



Combo de 20x20 v RTXN com doxirrubicina



20x20 v RTXN combo with Vincristine

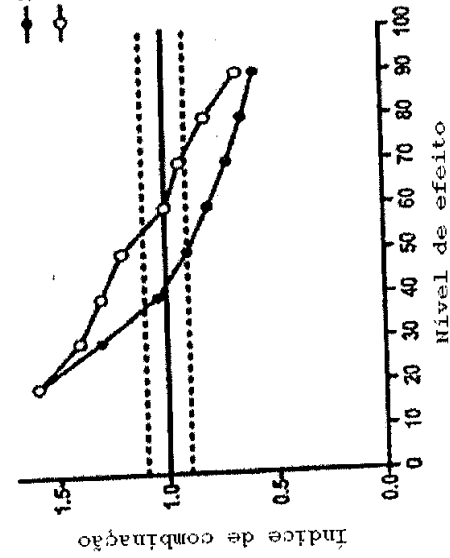


FIG. 61

RESUMOPROTEÍNAS DE LIGAÇÃO MULTIVALENTES DE CADEIA SIMPLES COM
FUNÇÃO EFETORA

São fornecidos peptídeos de ligação multivalentes,
5 incluindo peptídeos de ligação biespecíficos, que possuem
função efetora de imunoglobulina, juntamente com ácidos
nucléicos codificadores, vetores e células hospedeiras,
além de métodos para a produção desses peptídeos e métodos
para sua utilização para o tratamento ou prevenção de
10 diversas doenças, distúrbios ou condições, bem como para
atenuar pelo menos um sintoma associado a essas doenças,
distúrbios ou condições.