



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

(11) PI 0812795-6 B1



(22) Data do Depósito: 04/06/2008

(45) Data de Concessão: 03/12/2019

(54) Título: DOMÍNIO VARIÁVEL ÚNICO DE IMUNOGLOBULINA, ANTAGONISTA TIPO 1 DO RECEPTOR TNFALFA, USO DE UM DOMÍNIO OU ANTAGONISTA DE TNFR1, ÁCIDO NUCLEICO RECOMBINANTE, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/00; C07K 16/22; C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 06/06/2007 US 60/933632; 13/12/2007 GB 0724331.4.

(73) Titular(es): DOMANTIS LIMITED.

(72) Inventor(es): LAURENT JESPER; MALGORZATA PUPECKA; IAN TOMLINSON; CAROLYN ENEVER.

(86) Pedido PCT: PCT GB2008050405 de 04/06/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/149148 de 11/12/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/12/2009

(57) Resumo: DOMÍNIO VARIÁVEL ÚNICO DE IMUNOGLOBULINA, ANTAGONISTA TIPO 1 DO RECEPTOR TNFALFA, USO DE UM DOMÍNIO OU ANTAGONISTA DE TNFR1, ÁCIDO NUCLEICO RECOMBINANTE, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA A invenção diz respeito a polipeptídeos anti-TNFR1 e domínios variáveis únicos de anticorpos (dAbs) que são resistentes à degradação por uma protease, bem como a antagonistas compreendendo-os. Os polipeptídeos, dAbs e antagonistas são úteis para a terapêutica e/ou profilaxia, que são prováveis de encontrar proteases quando administrados a um paciente, por exemplo para administração pulmonar, administração oral, dispensação ao pulmão e dispensação ao trato gastrointestinal de um paciente, assim como para tratar de doenças inflamatórias, tais como a artrite ou a doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD).

DOMÍNIO VARIÁVEL ÚNICO DE IMUNOGLOBULINA, ANTAGONISTA TIPO 1 DO RECEPTOR TNFALFA, USO DE UM DOMÍNIO OU ANTAGONISTA DE TNFR1, ÁCIDO NUCLEICO RECOMBINANTE, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

[0001] A presente invenção diz respeito a polipeptídeos resistentes à protease, domínios variáveis únicos de imunoglobulina (anticorpo) e antagonistas do Fator de Necrose Antitumoral (membro 1A da superfamília do receptor TNF, TNFR1, p55, CD120a, P60, TNFRSF1A) compreendendo estes. A invenção ainda diz respeito aos usos, formulações, composições e dispositivos compreendendo tais ligandos anti-TNFR1.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] Os polipeptídeos e os peptídeos se têm tornado crescentemente agentes importantes em uma variedade de aplicações, incluindo aplicações industriais e o uso como agentes médicos, terapêuticos e diagnósticos. No entanto, em certos estados fisiológicos, tais como os estados inflamatórios (por exemplo, COPD) e o câncer, a quantidade de proteases presentes em um tecido, órgão ou animal (por exemplo no pulmão, no tumor ou adjacente a um tumor) pode aumentar. Este aumento nas proteases pode resultar em degradação e inativação aceleradas das proteínas endógenas e dos peptídeos, polipeptídeos e proteínas terapêuticas que sejam administradas para tratar da doença. Conseqüentemente, alguns agentes que possuam potencial para uso *in vivo* (por exemplo, uso no tratamento, diagnóstico ou prevenção da doença) têm apenas eficácia limitada porque eles são rapidamente degradados e inativados pelas proteases.

[0003] Os polipeptídeos resistentes às proteases proporcionam várias vantagens. Por exemplo, os polipeptídeos resistentes às proteases permanecem ativos *in vivo* por mais tempo do que os agentes sensíveis às proteases e, conseqüentemente, permanecem funcionais por um

proteases e, conseqüentemente, permanecem funcionais por um período de tempo que seja suficiente para produzir efeitos biológicos. Existe a necessidade de métodos melhorados para selecionar polipeptídeos que sejam resistentes à degradação das proteases e também tenham atividade biológica desejável.

TNFR1

O TNFR1 é um receptor da transmembrana contendo uma região extracelular que liga o ligando e um domínio intracelular que carece de atividade de transdução de sinal intrínseca, mas que pode associar-se com as moléculas de transdução de sinal. O complexo de TNFR1 com TNF ligado contém três cadeias de TNFR1 e três cadeias de TNF. [Banner *et al.*, *Cell*, 73(3) 431-445 (1993)]. O ligando de TNF se acha presente como um trímero, o qual é ligado por três cadeias de TNFR1. (Id.) As três cadeias de TNFR1 são agrupadas estritamente juntas no complexo de receptor-ligando, e este agrupamento é um pré-requisito para a transdução de sinal mediada por TNFR1. De fato, os agentes multivalentes que ligam TNFR1, tais como os anticorpos anti-TNFR1, podem induzir a aglomeração de TNFR1 e a transdução de sinal na ausência de TNF, e são comumente usados como agonistas de TNFR1 [ver, por exemplo, Belka *et al.*, *EMBO*, 14(6): 1156-1165 (1995); Mandik-Nayak *et al.*, *J. Immunol*, 167: 1920-1928 (2001)]. Conseqüentemente, os agentes multivalentes que ligam TNFR1 geralmente não são antagonistas eficazes de TNFR1, mesmo que eles bloqueiem a ligação de TNF α a TNFR1.

A região extracelular de TNFR1 compreende um segmento de terminal amino de treze aminoácidos [aminoácidos 1 a 13 da SEQ ID NO: 603 (humana); aminoácidos 1 a 13 da SEQ ID NO: 604 (camundongo)], Domínio 1 [aminoácidos 14 a 53 da SEQ ID NO: 603) (humana); aminoácidos 14 a 53 da SEQ ID NO: 604 (camundongo)], Domínio 2 aminoácidos 54 a 97 da SEQ ID NO: 603 (humana); aminoácidos 54 a 97 da

SEQ ID NO: 604 (camundongo)], Domínio 3 [aminoácidos 98 a 138 da SEQ ID NO: 603 (humana); aminoácidos 98 a 138 da SEQ ID NO: 604 (camundongo)], e Domínio 4 (aminoácidos 139 a 167 da SEQ ID NO: 603 (humana); aminoácidos 139 a 167 da SEQ ID NO: 604 (camundongo)] que é seguido por uma região proximal da membrana [aminoácidos 168 a 182 da SEQ ID NO: 603 (humana); aminoácidos 168 a 183 SEQ ID NO: 604 (camundongo)] (Ver Banner *et al.*, *Cell* 73(3) 431-445 (1993) e Loetscher *et al.*, *Cell* 61(2) 351-359 (1990)]. Os Domínios 2 e 3 fazem contato com o ligando ligado (TNF β , TNF α). (Banner *et al.*, *Cell*, 73(3) 431-445 (1993)]. A região extracelular de TNFR1 também contém uma região referida como o pré-ligando que liga o domínio de montagem ou o domínio PLAD (aminoácidos 1 a 53 da SEQ ID NO: 603 (humana); aminoácidos 1 a 53 da SEQ ID NO: 604 (camundongo)). [O Governo dos Estados Unidos, WO 01/58953; Deng *et al.*, *Nature Medicine*, doi: 10.1038/nm 1304 (2005)].

O TNFR1 é despreendido da superfície das células *in vivo* através de um processo que inclui a proteólise de TNFR1 no Domínio 4 ou na região proximal da membrana (aminoácidos 168 a 182 da SEQ ID NO: 603; aminoácidos 168 a 183 da SEQ ID NO:604), para produzir uma forma solúvel de TNFR1. O TNFR1 solúvel conserva a capacidade de ligar TNF α , e por esse meio funciona como um inibidor endógeno da atividade de TNF α .

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a invenção fornece um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 93 % idêntica à sequência de aminoácidos de DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3). Em uma forma de realização, o percentual de identidade é de pelo menos 94, 95, 96, 97, 98 ou 99 %. Em uma forma de realização, o polipeptídeo é DOM1h-131-206. A invenção ainda provê o monômero DOM1h-206 (substancialmente) puro. Em uma forma de realização, o DOM1h-131-206 é monômero pelo menos 98, 99, 99,5 % puro ou 100 % puro.

Em um aspecto, a invenção provê um polipeptídeo codificado por uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica à sequência de nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de DOM1h-131-206 (mostrada na Figura 19). Em uma forma de realização, o percentual de identidade é de pelo menos 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99 %.

Em um aspecto, a invenção provê um polipeptídeo codificado por uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 57 % idêntica à sequência de nucleotídeos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 19) e em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 93 % idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3). Em uma forma de realização, o percentual de identidade da sequência de nucleotídeos é de pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99 %. Em uma forma de realização, o percentual de identidade da sequência de aminoácidos é de pelo menos 94, 95, 96, 97, 98 ou 99 % ou 100 %. Por exemplo, a sequência de nucleotídeos pode ser uma versão otimizada pelo códon, da sequência de nucleotídeos de DOM1h-131-206 (mostrada na Figura 19). A otimização do códon das sequências é conhecida na técnica. Em uma forma de realização, a sequência de nucleotídeos é otimizada para expressão em uma célula hospedeira bacteriana (por exemplo, *E. coli* ou *Pseudomonas*, por exemplo *P. fluorescens*), de mamífero (por exemplo, CHO) ou de levedura (por exemplo, (por exemplo *Picchia* ou *Saccharomyces*, por exemplo *P. pastoris* ou *S. cerevisiae*).

Em um aspecto, a invenção provê uma proteína de fusão que compreende o polipeptídeo da invenção.

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 93 % idêntica à

sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3). Em uma forma de realização, o percentual de identidade é de pelo menos 94, 95, 96, 97, 98 ou 99 %.

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) resistente à protease que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90 % idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização destes aspectos, o percentual de identidade é de pelo menos 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99 %.

Em uma forma de realização, o domínio variável único de imunoglobulina compreende ácido aspártico na posição 53, em que a numeração é de acordo com Kabat (*“Sequences of Proteins of Immunological Interest”*, US Department of Health and Human Services 1991).

Em uma forma de realização, o domínio variável único de imunoglobulina compreende histidina na posição 91, em que a numeração é de acordo com Kabat.

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) que compreende uma sequência de aminoácidos que é idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206.

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) codificado por uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 80 % idêntica à sequência de nucleotídeos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 19). Em uma forma de realização, o percentual de identidade é de pelo menos 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99 %.

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) codificado por uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 57 idêntica à sequência

de nucleotídeos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 19) e em que o domínio variável compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 93 % idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3). Em uma forma de realização, o percentual de identidade da sequência de nucleotídeos é de pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99 %. Em uma forma de realização, o percentual de identidade da sequência de aminoácidos é de pelo menos 94, 95, 96, 97, 98 ou 99 % ou 100 %. Por exemplo, a sequência de nucleotídeos pode ser uma versão otimizada pelo códon da sequência de nucleotídeos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 19). A otimização pelo códon das sequências é conhecida na técnica. Em uma forma de realização, a sequência de nucleotídeos é otimizada para expressão em uma célula hospedeira bacteriana (por exemplo, *E. coli* ou *Pseudomonas*, por exemplo *P. fluorescens*), de mamífero (por exemplo, CHO) ou de levedura (por exemplo, *Picchia* ou *Saccharomyces*, por exemplo *P. pastoris* ou *S. cerevisiae*).

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) codificado por uma sequência que é idêntica à sequência de nucleotídeos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 19).

Em um aspecto, a invenção provê um antagonista do receptor de TNF α (TNFR1; p55) compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina anti-TNFR1 de acordo com a invenção. Em uma forma de realização, o antagonista compreende primeiro e segundo domínios variáveis únicos de imunoglobulina, em que cada domínio variável é de acordo com a invenção. Por exemplo, em que o antagonista compreende um monômero do referido domínio variável único ou um homodímero do referido domínio variável único. Em uma forma de realização, a sequência de aminoácidos do, ou de cada, domínio variável único é idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3).

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) compreendendo uma sequência de aminoácidos que é idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) ou difere da sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 por não mais do que 25 posições de aminoácidos e tem uma sequência de CDR1 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR1 do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização, a diferença é não superior a 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 posição de aminoácido. Em uma forma de realização, a identidade da sequência de CDR é pelo menos de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %.

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) compreendendo uma sequência de aminoácidos que é idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) ou difere da sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 por não mais do que 25 posições de aminoácidos e tem uma sequência de CDR2 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR2 do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização, a diferença é não superior a 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 posição de aminoácido. Em uma forma de realização, a identidade da sequência de CDR é pelo menos de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %.

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) compreendendo uma sequência de aminoácidos que é idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) ou difere da sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 por não mais do que 25 posições de aminoácidos e tem uma sequência de CDR3 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR3 do DOM1h-131-206. Em uma forma de

realização, a diferença é não superior a 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 posição de aminoácido. Em uma forma de realização, a identidade da sequência de CDR é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %.

5 Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) compreendendo uma sequência de aminoácidos que é idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) ou difere da sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 por não mais do que 25
10 posições de aminoácidos e tem uma sequência de CDR1 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR1 do DOM1h-131-206 e tem uma sequência de CDR2 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR2 do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização, a diferença é não superior a 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 posição
15 de aminoácido. Em uma forma de realização, uma, ou ambas, as identidades da sequência de CDR é respectivamente de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %.

 Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55)
20 compreendendo uma sequência de aminoácidos que é idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) ou difere da sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 em não mais do que 25 posições de aminoácidos e tem uma sequência de CDR1 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR1 do DOM1h-131-206 e tem uma sequência
25 de CDR3 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR3 do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização, a diferença é de não mais do que 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 posição de aminoácido. Em uma forma de realização, uma ou ambas as identidades de sequência de CDR são respectivamente de pelo menos 55, 60,

65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %.

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) compreendendo uma sequência de aminoácidos que é idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) ou difere da sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 em não mais do que 25 posições de aminoácidos e tem uma sequência de CDR2 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR2 do DOM1h-131-206 e tem uma sequência de CDR3 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR3 do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização, a diferença é de não mais do que 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 posição de aminoácido. Em uma forma de realização, uma ou ambas as identidades de sequência de CDR são respectivamente de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %.

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único da imunoglobulina do receptor anti-TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) que compreende uma sequência de aminoácidos que é idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) ou difere da sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 em não mais do que 25 posições de aminoácidos e tem uma sequência de CDR1 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR1 do DOM1h-131-206 e tem uma sequência de CDR2 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR2 do DOM1h-131-206 e tem uma sequência de CDR3 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR3 do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização, a diferença é de não mais do que 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 posição de aminoácido. Em uma forma de realização, uma ou duas, ou cada uma, identidade de sequência de CDR é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %, respectivamente.

Em um aspecto, a invenção provê um antagonista do receptor de TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) tendo uma sequência de CDR1 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR1 do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3). Em uma forma de realização, a identidade de sequência de CDR é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %. O antagonista pode ser resistente à protease, por exemplo a uma ou mais das proteases aqui descritas, por exemplo sob um conjunto de condições como descritas neste relatório.

Em um aspecto, a invenção provê um antagonista do receptor de TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) tendo uma sequência de CDR2 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR1 do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3). Em uma forma de realização, a identidade de sequência de CDR é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %. O antagonista pode ser resistente à protease, por exemplo a uma ou mais das proteases aqui descritas, por exemplo sob um conjunto de condições como aqui descritas.

Em um aspecto, a invenção provê um antagonista do receptor de TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) tendo uma sequência de CDR3 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR1 do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3). Em uma forma de realização, a identidade de sequência de CDR é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %. O antagonista pode ser resistente à protease, por exemplo a uma ou mais das proteases aqui descritas, por exemplo sob um conjunto de condições como aqui descritas.

Em um aspecto, a invenção provê um antagonista do receptor de TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) tendo uma sequência de CDR1 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR1 do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) e uma sequência de CDR2 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR2 do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização, a

identidade de sequência de CDR de uma ou de ambas as CDRs é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %. O antagonista pode ser resistente à protease, por exemplo a uma ou mais das proteases aqui descritas, por exemplo sob um conjunto de condições como aqui descritas.

5 Em um aspecto, a invenção provê um antagonista do receptor de TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) tendo uma sequência de CDR1 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR1 do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) e uma sequência de CDR3 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR3 do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização, a
10 identidade de sequência de CDR de uma ou de ambas as CDRs é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 % respectivamente. O antagonista pode ser resistente à protease, por exemplo a uma ou mais das proteases aqui descritas, por exemplo sob um conjunto de condições como aqui descritas.

15 Em um aspecto, a invenção provê um antagonista do receptor de TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) tendo uma sequência de CDR2 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR2 do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) e uma sequência de CDR3 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR3 do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização, a
20 identidade de sequência de uma ou de ambas CDRs é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %, respectivamente. O antagonista pode ser resistente à protease, por exemplo a uma ou mais das proteases aqui descritas, por exemplo sob um conjunto de condições como descritas neste relatório.

25 Em um aspecto, a invenção provê um antagonista do receptor de TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) tendo uma sequência de CDR1 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR1 do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3) e uma sequência de CDR2 que é pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR2 do DOM1h-131-206 e uma sequência de CDR3 que é

pelo menos 50 % idêntica à sequência de CDR3 do DOM1h-131-206. Em uma forma de realização, a identidade de sequência da CDR de uma ou de duas, ou de cada, das CDRs, é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 %, respectivamente. O antagonista pode ser resistente à protease, por exemplo uma ou mais das proteases aqui descritas, por exemplo sob um conjunto de condições conforme aqui descritas.

Em um aspecto, a invenção provê um antagonista do receptor de TNF α tipo 1 (TNFR1; p55) compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina contendo as sequências de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 (por exemplo, CDR1, CDR2 e/ou CDR3, CDR1 e 2, CDR1 e 3, CDR2 e 3 ou CDR1, 2 e 3) do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3). O antagonista pode ser resistente à protease, por exemplo uma ou mais das proteases conforme aqui descritas, por exemplo sob um conjunto de condições como descritas neste relatório.

Em um aspecto, a invenção provê um antagonista do receptor de TNF α (TNFR1; p55) que compete com o DOM1h-131-206 para ligar-se a TNFR1. Assim, o antagonista pode ligar o mesmo epítipo como DOM1h-131-206 ou um epítipo de sobreposição. Em uma forma de realização, o antagonista compreende um domínio variável único de imunoglobulina tendo uma sequência de aminoácidos que seja pelo menos 93 % idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3). Em uma forma de realização, o percentual de identidade é de pelo menos 94, 95, 96, 97, 98 ou 99 %. O antagonista pode ser resistente à protease, por exemplo uma ou mais das proteases aqui descritas, por exemplo sob um conjunto de condições como aqui descritas. Em uma forma de realização, o antagonista é um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, tal como um fragmento monovalente de ligação a antígeno (por exemplo, scFv, Fab, Fab', dAb) que tenha especificidade de ligação para TNFR1. Outros exemplos de antagonistas são os ligandos aqui descritos, que ligam a TNFR1. Os ligandos

podem compreender um domínio variável único de imunoglobulina ou anticorpo de domínio (dAb) que tenha especificidade de ligação quanto a TNFR1, ou regiões determinantes da complementaridade de um tal dAb em um formato adequado. Em algumas formas de realização, o ligando é um monômero de dAb) que consiste essencialmente em, ou consiste em, um domínio variável único de imunoglobulina ou dAb que tenha especificidade de ligação quanto a TNFR1. Em outras formas de realização, o ligando é um polipeptídeo que compreende um dAb (ou as CDRs de um dAb) em um formato adequado, tal como um formato de anticorpo.

10 Alguns antagonistas de TNFR1 da invenção não inibem a ligação do TNF α a TNFR1, mas inibem a transdução de sinal mediada através de TNFR1. Por exemplo, um antagonista de TNFR1 pode inibir o agrupamento de TNFR1 induzido pelo TNF α , que precede a transdução de sinal através de TNFR1. Tais antagonistas proporcionam várias vantagens. Por exemplo, na presença de um tal antagonista, o TNF α pode ligar TNFR1 expresso sobre a superfície das células e ser removido do ambiente celular, porém a transdução de sinal mediada por TNFR1 não será ativada. Assim, a produção induzida pelo sinal de TNFR1, do TNF α adicional e de outros mediadores da inflamação, será inibida. De forma semelhante, os antagonistas de TNFR1 que ligam TNFR1 e inibem a transdução de sinal mediada através de TNFR1, mas não inibem a ligação de TNF α a TNFR1, não inibirão a ligação do TNF α e a atividade de inibição do TNFR1 solúvel endogenamente produzido. Consequentemente, a administração de um tal antagonista a um mamífero em necessidade deste, pode complementar as vias reguladoras endógenas que inibem a atividade de TNF α e a atividade de TNFR1 *in vivo*. A invenção também diz respeito a ligandos que (i) ligam TNFR1 (por exemplo, no Domínio 1), (ii) antagonizam a ativação da transdução de sinal mediada por TNFR1, e (iii) não inibem a ligação do TNF α a TNFR1. Um tal ligando se liga a TNFR1 solúvel e não impede o receptor solúvel de se ligar a

TNF α e, assim, administrando-se um tal antagonista a um mamífero em necessidade de tal tratamento pode-se complementar as vias reguladoras endógenas que inibem a atividade de TNF α *in vivo* mediante o aumento da meia-vida do receptor solúvel no soro. Estas vantagens são particularmente relevantes para os ligandos que tenham sido formatados para terem um tamanho hidrodinâmico maior, por exemplo pela articulação de um grupo de PEG, albumina sérica, transferrina, receptor da transferrina ou, pelo menos, a sua porção de ligação à transferrina, uma região Fc de anticorpo, ou pela conjugação a um domínio de anticorpo. Por exemplo, um agente (por exemplo, polipeptídeo, domínio variável ou antagonista) que i) liga TNFR1 (por exemplo, no Domínio1), (ii) antagoniza a ativação da transdução de sinal mediada por TNFR1, e (iii) não inibe a ligação do TNF α a TNFR1, tal como um monômero de dAb, pode ser formatado como um fragmento maior de ligação a antígeno de um anticorpo ou como anticorpo (por exemplo, formatado como um Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv). O tamanho hidrodinâmico de um ligando e sua meia-vida sérica podem também ser aumentados pela conjugação ou ligação de um agente de ligação de TNFR1 (antagonista; domínio variável) a um domínio de ligação (por exemplo, anticorpo ou fragmento de anticorpo) que liga um antígeno ou epítipo que aumenta a meia-vida *in vivo*, como descrito neste relatório (ver o Anexo 1 da WO 2006/038027, aqui incorporado como referência em sua totalidade). Por exemplo, o agente de ligação a TNFR1 (por exemplo, polipeptídeo) pode ser conjugado ou ligado a uma albumina anti-soro ou anticorpo de receptor Fc anti-neonatal ou fragmento de anticorpo, por exemplo um receptor Fc anti-SA ou anti-neonatal dAb, Fab, Fab' ou scFv, ou a um anticorpo ou anticorpo do receptor Fc anti-neonatal.

Exemplos de albumina, fragmentos de albumina ou variantes de albumina adequados para uso em um ligando de ligação a TNFR1 de acordo com a invenção, são descritos nas WO 2005/077042 A2 e WO

2006/038027, que são aqui incorporadas como referência em sua totalidade.

Em outras formas de realização da invenção descritas na totalidade deste relatório descritivo, ao invés do uso de um “dAb” em um antagonista ou ligando da invenção, considera-se que o interessado habilitado
5 possa usar um domínio que compreenda as CDRs de um dAb que ligue a TNFR1 (por exemplo, CDRs enxertadas em um andaime ou esqueleto protéico adequado, por exemplo um aficorpo, um andaime de SpA, domínio de classe A do receptor de LDL ou um domínio de EGF) ou possa ser um
10 domínio protéico compreendendo um sítio de ligação para TNFR1, por exemplo em que o domínio seja selecionado de um aficorpo, um domínio de SpA, um domínio de classe A do receptor de LDL ou um domínio de EGF. A apresentação como um todo deve ser interpretada portanto para prover a apresentação de antagonistas, ligandos e métodos usando tais domínios no lugar de um dAb.

15 Polipeptídeos, domínios variáveis únicos de imunoglobulina e antagonistas da invenção podem ser resistentes a uma ou mais das seguintes: serina protease, cisteína protease, aspartato proteases, tiol proteases, metaloprotease matriz, carboxipeptidase (por exemplo, a carboxipeptidase A, a carboxipeptidase B), tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, elastase,
20 leucozima, pancreatina, trombina, plasmina, catepsinas (por exemplo a catepsina G), proteinase (por exemplo, proteinase 1, proteinase 2, proteinase 3), termolisina, quimosina, enteropeptidase, caspase (por exemplo, caspase 1, caspase 2, caspase 4, caspase 5, caspase 9, caspase 12, caspase 13), calpaina, ficaina, clostripaina, actinidaina, bromelaina e separase. Nas formas de
25 realização particulares, a protease é tripsina, elastase ou leucozima. A protease pode também ser fornecida por um extrato biológico, homogeneizado biológico ou preparação biológica. Em uma forma de realização, a protease é uma protease encontrada no esputo, no muco (por exemplo, o muco gástrico, o muco nasal, o muco brônquico), na lavagem

broncoalveolar, no homogeneizado pulmonar, no extrato pulmonar, no extrato pancreático, no fluido gástrico, na saliva ou nas lágrimas. Em uma forma de realização, a protease é aquela encontrada nos olhos e/ou nas lágrimas. Em uma forma de realização, a protease é uma protease não bacteriana. Em uma forma de realização, a protease é uma protease animal, por exemplo de mamífero, por exemplo de um ser humano. Em uma forma de realização, a protease é uma protease do trato gastrointestinal ou uma protease do tecido pulmonar, por exemplo uma protease do trato gastrointestinal ou uma protease do tecido pulmonar encontradas nos seres humanos. Tais proteases aqui listadas também podem ser usadas nos métodos descritos neste relatório envolvendo a exposição de um repertório de biblioteca para uma protease.

Em um aspecto, a invenção provê um domínio variável único de imunoglobulina resistente à protease, compreendendo um sítio de ligação do receptor de TNF α do tipo 1 (TNFR1; p55), em que o domínio variável seja resistente à protease, por exemplo tripsina, quando incubado com

(i) uma concentração (c) de pelo menos 10 microgramas/ml de protease em 37 °C pelo tempo (t) de pelo menos uma hora; ou

(ii) uma concentração (c') de pelo menos 40 microgramas/ml de protease em 30 °C pelo tempo (t) de pelo menos uma hora, em que o domínio variável compreende e a sequência de aminoácidos que é pelo menos 90 % idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrado na Figura 3). Em uma forma de realização a relação (em uma base de mol/mol) de protease, por exemplo tripsina, para domínio variável é de 8.000 para 80.000 de protease:domínio variável, por exemplo quando C seja 10 microgramas/ml, a relação de protease:domínio variável é de 800 para 80.000; ou quando C ou C' é 100 microgramas/ml, a relação de protease:domínio variável é de 8.000 para 80.000. Em uma forma de realização, a relação (em uma base de peso/peso, por exemplo micrograma/micrograma) de protease (por exemplo tripsina) para domínio variável é de 16.000 para 160.000 de

protease:domínio variável, por exemplo quando C seja 10 microgramas/ml, a relação é de 1.600 para 160.000 de protease:domínio variável; ou quando C ou C' seja de 100 microgramas/ml, a relação de protease:domínio variável é de 1.600 para 160.000. Em uma forma de realização, a concentração (c ou c') é de pelo menos 100 ou 1000 microgramas/ml de protease. Em uma forma de realização, a concentração (c ou c') é de pelo menos 100 ou 1000 microgramas/ml de protease. Referência é feita à descrição neste relatório das condições adequadas para a atividade proteolítica da protease para uso quando do trabalho com repertórios ou bibliotecas de peptídeos ou polipeptídeos (por exemplo, parâmetros em p/p). Estas condições podem ser usadas em situações para determinar a resistência à protease de um domínio variável único de imunoglobulina particular. Em uma forma de realização, o tempo (t) é, ou é cerca de, uma, três ou 24 horas ou durante a noite (por exemplo, cerca de 12 a 16 horas). Em uma forma de realização, o domínio variável é resistente sob condições (i) e a concentração (c) é, ou é cerca de, 10 ou 1000 microgramas/ml de protease, e o tempo (t) é de 1 hora. Em uma forma de realização, o domínio variável é resistente sob condições (ii) e a concentração (c') é, ou é cerca de, 40 microgramas/ml de protease e o tempo (t) é, ou é cerca de, 3 horas. Em uma forma de realização, a protease é selecionada de tripsina, elastase, leucosima e pancreatina. Em uma forma de realização, a protease é tripsina. Em uma forma de realização, a protease é uma protease encontrada no esputo, no muco (por exemplo, o muco gástrico, o muco nasal, o muco brônquico), na lavagem broncoalveolar, no homogeneizado pulmonar, no extrato pulmonar, no extrato pancreático, no fluido gástrico, na saliva ou nas lágrimas. Em uma forma de realização, a protease é aquela encontrada nos olhos e/ou nas lágrimas. Em uma forma de realização, a protease é uma protease não bacteriana. Em uma forma de realização, a protease é uma protease animal, por exemplo de mamífero, por exemplo de um ser humano. Em uma forma de realização, a protease é uma protease do trato

gastrintestinal ou uma protease do tecido pulmonar, por exemplo uma protease do trato gastrointestinal ou uma protease do tecido pulmonar encontradas nos seres humanos. Tais proteases aqui listadas também podem ser usadas nos métodos descritos neste relatório envolvendo a exposição de um repertório de biblioteca para uma protease.

Em uma forma de realização, o domínio variável é resistente à tripsina e/ou a pelo menos uma outra protease selecionada de elastase, leucosima e pancreatina. Por exemplo, a resistência é à tripsina e à elastase; à tripsina e à leucosima; à tripsina e à pancreatina; à tripsina, elastase e leucosima; à tripsina, elastase e pancreatina; à tripsina, elastase, pancreatina e leucosima; ou tripsina, pancreatina e leucosima.

Em uma forma de realização, o domínio variável é exposto sobre bacteriófago quando incubado sob as condições (i) ou (ii), por exemplo em um tamanho de biblioteca de fago de 10^6 a 10^{13} , por exemplo 10^8 a 10^{12} unidades replicadoras (vírions infecciosos).

Em uma forma de realização, o domínio variável liga especificamente TNFR1 em seguida à incubação sob as condições (i) ou (ii), por exemplo avaliadas com o uso de BiaCore[®] ou ELISA, por exemplo ELISA de fago ou ELISA de fago monoclonal.

Em uma forma de realização, os domínios variáveis da invenção especificamente liga a proteína A ou a proteína L. Em uma forma de realização, a ligação específica à proteína A ou L se acha presente em seguida à incubação sob as condições (i) ou (ii).

Em uma forma de realização, os domínios variáveis da invenção podem ter uma OD_{450} (lendo-se no ELISA, por exemplo ELISA de fago ou ELISA ou o ELISA de fago monoclonal) de pelo menos 0,404, por exemplo em seguida à incubação sob as condições (i) ou (ii).

Em uma forma de realização, os domínios variáveis da invenção apresentam (substancialmente) uma faixa única na eletroforese em

gel, por exemplo em seguida à incubação sob as condições (i) ou (ii).

Em certas formas de realização, a invenção provê um antagonista de TNFR1 que é ligando específico duplo que compreende um primeiro dAb de acordo com a invenção, que liga TNFR1, e um segundo dAb que tem a mesma ou diferente especificidade de ligação do primeiro dAb. O segundo dAb pode ligar um alvo selecionado de ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, CEA, CD40, Ligando de CD40, CD56, CD38, CD138, EGF, receptor de EGF, ENA-78, Eotaxin, Eotaxin-2, Exodus-2, FAP α , FGF-acídico, FGF-básico, fator 10 de crescimento de fibroblasto, ligando FLT3, Fractalkine (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- β 1, albumina de soro humano, insulina, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL-1 α , IL-1 β , receptor IL-1, receptor IL-1 tipo 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inibina α , Inibina β , IP-10, fator-2 de crescimento ceratinócito (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, substância inibidora de Mülleriano, fator inibidor da colônia de monócitos, proteína atraente de monócitos, M-CSF, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MCP-I (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, fator-1 inibidor do precursor mielóide (MPIF-1), NAP-2, Neurturina, fator de crescimento nervoso, β -NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, fator de células tronco (SCF), TARC, TGF- α , TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, fator de necrose tumoral (TNF), TNF- α , TNF- β , receptor I de TNF, receptor II de TNF, TNIL-1, TPO, VEGF, VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D, receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF, receptor 3 de VEGF, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, albumina sérica, vWF, proteínas amilóides (por exemplo, amilóide α), MMP12, PDK1, IgE, IL-13R α 1, IL-13Ra2, IL-15, IL-15R, IL-16, IL-17R, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-23, IL-23R, IL-25, CD2, CD4, CD11a, CD23, CD25, CD27, CD28,

CD30, CD40, CD40L, CD56, CD138, ALK5, EGFR, FcER1, TGFb, CCL2, CCL18, CEA, CR8, CTGF, CXCL12 (SDF-1), quimase, FGF, Furina, Endotelina-1, Eotaxinas (por exemplo, Eotaxina, Eotaxina-2, Eotaxina-3), GM-CSF, ICAM-1, ICOS, IgE, IFNa, I-309, integrinas, L-selectina, MIF, MIP4, MDC, MCP-1, MMPs, neutrófilo elastase, osteopontina, OX-40, PARC, PD-1, RANTES, SCF, SDF-1, siglec8, TARC, TGFb, Trombina, Tim-1, TNF, TRANCE, Triptase, VEGF, VLA-4, VCAM, $\alpha 4\beta 7$, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, alfavbeta6, alfavbeta8, cMET, CD8, vWF, proteínas amilóides (por exemplo, alfa amilóide), MMP12, PDK1 e IgE.

Em um exemplo, o ligando específico duplo compreende um primeiro dAb que liga um primeiro epítopo na TNFR1 e um segundo dAb que liga um epítopo em um alvo diferente. Em outro exemplo, o segundo dAb liga um epítopo na albumina sérica.

Em outras formas de realização, o ligando é um ligando multiespecífico que compreende um primeiro domínio de ligação a epítopo que tem especificidade de ligação para TNFR1 e pelo menos um outro domínio de ligação a epítopo que tem especificidade de ligação diferente do primeiro domínio de ligação a epítopo. Por exemplo, o primeiro domínio de ligação a epítopo pode ser um dAb que liga TNFR1 ou pode ser um domínio que compreenda as CDRs de um dAb que liga TNFR1 (por exemplo, CDRs enxertadas sobre um andaime ou esqueleto protéico adequado, por exemplo um aficorpo, um andaime SpA, um domínio classe A do receptor de LDL ou um domínio de EGF).

Em certas formas de realização, o polipeptídeo, o antagonista, o ligando ou monômero de dAb anti-TNFR1, são caracterizados por um ou mais dos seguintes: 1) se desassocia da TNFR1 humana com uma constante de desassociação (K_d) de 50 nM a 20 pM, e uma constante de índice K_{off} (constante do índice de dissociação) de 5×10^{-1} a 1×10^7 s⁻¹ conforme

determinado pela ressonância de plásmon superficial; 2) inibe a ligação do Fator Alfa de Necrose Tumoral (TNF α) à TNFR1 com uma IC50 de 500 nM a 50 pM; 3) neutraliza a TNFR1 humana em um ensaio padrão de células L929 com um ND50 de 500 nM a 50 pM; 4) antagoniza a atividade da TNFR1 em um ensaio celular padrão com uma ND₅₀ \leq 100 nM, e em uma concentração \leq 10 μ M o dAb agoniza a atividade da TNFR1 em \leq 5 % no ensaio; 5) inibe a letalidade no modelo de choque séptico induzido pela galactosamina de LPS/D de camundongo; 6) resiste à agregação; 7) é secretado em uma quantidade de pelo menos cerca de 0,5 mg/litro quando expresso nas espécies de *E. coli* ou de *Pichia* (por exemplo, *P. pastoris*); 8) se desdobra reversivelmente; 9) tem eficácia em um modelo de doença inflamatória crônica selecionada do grupo consistindo no modelo de artrite induzida por colágeno de camundongo, modelo de artrite Δ ARE de camundongo, modelo de Δ ARE de doença inflamatória intestinal de camundongo, modelo induzido pelo dextrano sulfato de sódio de camundongo da doença inflamatória intestinal, modelo do fumo de tabaco em camundongo da doença pulmonar obstrutiva crônica, e modelos de primatas adequados (por exemplo, o modelo de artrite induzida pelo colágeno em primatas); e/ou 10) tem eficácia no tratamento, na supressão ou na prevenção de uma doença inflamatória crônica. Referência é feita à WO 2006/038027 quanto a detalhes dos ensaios e testes e parâmetros aplicáveis às condições (1) a (10), e esta fica aqui incorporada como referência.

Em formas de realização particulares, o polipeptídeo, o antagonista, o ligando ou o monômero de dAb se desassocia da TNFR1 humana com uma constante de dissociação (K_d) de 50 nM a 20 pM, e um de índice constante K_{off} (constante do índice de dissociação) de 5×10^{-1} a 1×10^7 s⁻¹ conforme determinado pela ressonância de plásmon superficial; inibe a ligação do Fator Alfa de Necrose Tumoral (TNF α) à TNFR1 com uma IC50 de 500 nM a 50 pM; e neutraliza a TNFR1 humana em um ensaio padrão de

células L929 com um ND50 de 500 nM a 50 pM. Em outras formas de realização particulares, o polipeptídeo, o antagonista, o ligando ou o monômero de dAb se desassocia da TNFR1 humana com uma constante de dissociação (K_d) de 50 nM a 20 pM, e um de índice constante K_{off} (constante do índice de dissociação) de 5×10^{-1} a $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$; inibe a ligação do Fator Alfa de Necrose Tumoral ($\text{TNF}\alpha$) à TNFR1 com uma IC50 de 500 nM a 50 pM; e tem uma eficácia em um modelo de doença inflamatória crônica selecionada do grupo consistindo no modelo de artrite induzida pelo colágeno de camundongo, modelo Δ ARE de camundongo da artrite, modelo de artrite Δ ARE de camundongo, modelo de Δ ARE de doença inflamatória intestinal de camundongo, modelo induzido pelo dextrano sulfato de sódio de camundongo da doença inflamatória intestinal, modelo do fumo de tabaco em camundongo da doença pulmonar obstrutiva crônica, e modelos de primatas adequados (por exemplo, o modelo de artrite induzida pelo colágeno em primatas). Em outras formas de realização particulares, o polipeptídeo, o antagonista, o ligando ou o monômero de dAb se desassocia da TNFR1 humana com uma constante de dissociação (K_d) de 50 nM a 20 pM, e um de índice constante K_{off} (constante do índice de dissociação) de 5×10^{-1} a $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ conforme determinado pela ressonância de plásmon superficial; neutraliza a TNFR1 humana em um ensaio padrão de células L929 com uma ND50 de 500 nM a 50 pM; e antagoniza a atividade da TNFR1 em um ensaio de células padrão com uma $\text{ND}_{50} \leq 100 \text{ nM}$, e em uma concentração $\leq 10 \text{ }\mu\text{M}$ o dAb agoniza a atividade da TNFR1 em $\leq 5 \%$ no ensaio.

Os polipeptídeos resistentes à protease, os domínios variáveis únicos de imunoglobulina e os antagonistas da invenção têm utilidade na terapia, profilaxia e diagnóstico de doenças ou condições nos mamíferos, por exemplo nos seres humanos. Em particular, eles têm utilidade como a base dos medicamentos que sejam prováveis de encontrar proteases quando administrados a um paciente, tal como um ser humano. Por exemplo, quando

administrados ao trato gastrintestinal (por exemplo administrados por via oral, sublingual, retal), em cujo caso os polipeptídeos, os domínios variáveis únicos de imunoglobulina e os antagonistas podem ser submetidos à protease em um ou mais dentre o trato gastrintestinal superior, o trato gastrintestinal inferior, a boca, o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso. Uma forma de realização, portanto, leva em conta um polipeptídeo resistente à protease, domínio variável único de imunoglobulina ou antagonista, a serem administrados por via oral, sublingual ou retal ao trato gastrintestinal de um paciente para tratar e/ou prevenir uma doença ou condição no paciente. Por exemplo, a administração oral a um paciente (por exemplo um paciente humano) para o tratamento e/ou a prevenção de uma condição ou doença mediadas pelo TNF alfa, tal como a artrite (por exemplo a artrite reumatóide), IBD, psoríase ou doença de Crohn. Em outro exemplo, o polipeptídeo, o domínio variável ou o antagonista são prováveis de encontrar a protease quando administrados (por exemplo por inalação ou pela via intranasal) ao tecido pulmonar (por exemplo o pulmão ou as vias aéreas). Uma forma de realização, portanto, leva em conta a administração do polipeptídeo resistente à protease, o domínio variável único de imunoglobulina, ou antagonista, a um paciente (por exemplo, a um ser humano), por inalação ou por via intranasal, ao tecido pulmonar do paciente para nele tratar e/ou prevenir uma doença ou condição. Tal condição pode ser asma (por exemplo asma alérgica), COPD, influenza ou qualquer outra doença ou condição pulmonar descrita na WO 2006/038027, aqui incorporada como referência. Em outro exemplo, o polipeptídeo, o domínio variável ou o antagonista são prováveis de encontrar a protease quando administrados (por exemplo por injeção intraocular ou como colírio) a um olho de um paciente. Uma forma de realização, portanto, leva em conta a administração ocular do polipeptídeo, do domínio variável único de imunoglobulina ou do antagonista resistentes à protease, a um paciente (por exemplo a um ser humano) para tratar e/ou prevenir uma doença

ou condição (por exemplo, uma doença ou condição dos olhos) no paciente. A administração pode ser uma administração tópica ao olho, na forma de colírio, ou por injeção dentro do olho, por exemplo dentro do humor vítreo.

Os antagonistas, polipeptídeos e domínios variáveis únicos de imunoglobulina de acordo com a invenção, podem apresentar temperaturas de fusão (T_m) melhoradas ou relativamente elevadas, proporcionando estabilidade intensificada. A ligação alvo de alta afinidade pode também, ou alternativamente, ser um aspecto dos antagonistas, polipeptídeos e domínios variáveis. Um ou mais destes aspectos, combinados com a resistência à protease, tornam os antagonistas, os domínios variáveis e os polipeptídeos acessíveis ao uso como medicamentos nos mamíferos, tais como os seres humanos, em que as proteases devem provavelmente ser encontradas, por exemplo para administração no trato gastrointestinal ou no tecido pulmonar.

Assim, em um aspecto, a invenção provê o antagonista de TNFR1 para dispensação oral. Em um aspecto, a invenção provê o antagonista de TNFR1 para dispensação ao trato gastrointestinal de um paciente. Em um aspecto, a invenção provê o uso do antagonista de TNFR1 na fabricação de um medicamento para dispensação oral. Em um aspecto, a invenção provê o uso do antagonista de TNFR1 na fabricação de um medicamento para dispensação ao trato gastrointestinal de um paciente. Em uma forma de realização, o domínio variável é resistente à tripsina e/ou a pelo menos uma outra protease selecionada de elastase, leucosima e pancreatina. Por exemplo, a resistência é à tripsina e elastase; tripsina e leucosima; tripsina e pancreatina; tripsina, elastase e leucosima; tripsina, elastase e pancreatina; tripsina, elastase, pancreatina e leucosima; ou tripsina, pancreatina e leucosima.

Em um aspecto, a invenção provê o antagonista de TNFR1 para dispensação pulmonar. Em um aspecto, a invenção provê o antagonista de TNFR1 para dispensação ao pulmão de um paciente. Em um aspecto, a

invenção provê o uso do antagonista de TNFR1 na fabricação de um medicamento para dispensação pulmonar. Em um aspecto, a invenção provê o uso do antagonista de TNFR1 na fabricação de um medicamento para dispensação ao pulmão de um paciente. Em uma forma de realização, o domínio variável é resistente à leucocima.

Em um aspecto, a invenção provê um método de dispensação oral ou dispensação de um medicamento ao trato gastrintestinal de um paciente ou ao pulmão ou tecido pulmonar de um paciente, método este que compreende administrar ao paciente uma quantidade farmacologicamente eficaz de um antagonista de TNFR1 da invenção.

Em um aspecto, a invenção provê o antagonista de TNFR1 da invenção para tratamento e/ou profilaxia de uma condição inflamatória. Em um aspecto, a invenção provê o uso do antagonista de TNFR1 na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou profilaxia de uma condição inflamatória. Em uma forma de realização, a condição é selecionada do grupo consistindo de artrite, esclerose múltipla, doença inflamatória dos intestinos e doença pulmonar obstrutiva crônica. Por exemplo, referida artrite é a artrite reumatóide ou a artrite reumatóide juvenil. Por exemplo, a referida doença inflamatória dos intestinos é selecionada do grupo consistindo em doença de Crohn e colite ulcerativa. Por exemplo, referida doença pulmonar obstrutiva crônica é selecionada do grupo consistindo em bronquite crônica, bronquite obstrutiva crônica e enfisema. Por exemplo, referida pneumonia é pneumonia bacteriana. Por exemplo, referida pneumonia bacteriana é a pneumonia estafilocócica.

Em um aspecto, a invenção provê o antagonista de TNFR1 para tratamento e/ou profilaxia de uma doença respiratória. Em um aspecto, a invenção provê o uso do antagonista de TNFR1 na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou profilaxia de uma doença respiratória. Por exemplo, referida doença respiratória é selecionada do grupo consistindo em

inflamação pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, pneumonia, pneumonite de hipersensibilidade, infiltrado pulmonar com eosinofilia, doença pulmonar ambiental, pneumonia, bronquiectasia, fibrose cística, doença pulmonar intersticial, hipertensão pulmonar primária, tromboembolismo pulmonar, distúrbios da pleura, distúrbios do mediastino, distúrbios do diafragma, hipoventilação, hiperventilação, apnéia de sono, síndrome da angústia respiratória aguda, mesotelioma, sarcoma, rejeição de enxerto, doença do enxerto versus hospedeiro, câncer pulmonar, rinite alérgica, alergia, asbestose, aspergiloma, aspergilose, bronquiectasia, bronquite crônica, enfisema, pneumonia eosinofílica, fibrose pulmonar idiopática, doença pneumocócica invasiva, influenza, micobactérias não tuberculosas, efusão pleural, pneumoconiose, pneumocitose, pneumonia, actinomicose pulmonar, proteinose alveolar pulmonar, carbúnculo pulmonar, edema pulmonar, êmbolo pulmonar, inflamação pulmonar, histiocitose X pulmonar, hipertensão pulmonar, nocardiose pulmonar, tuberculose pulmonar, doença venoclusiva pulmonar, doença reumatóide dos pulmões, sarcoidose e granulomatose de Wegener. Por exemplo, a doença é a doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD). Por exemplo, a doença é asma.

Um antagonista da invenção compreendendo um agente que iniba TNFR1 (por exemplo, em que o agente seja selecionado do grupo consistindo em fragmentos de anticorpos (por exemplo, o fragmento Fab, o fragmento Fab', o fragmento Fv (por exemplo, scFv, Fv ligado a dissulfeto), fragmento F(ab')₂, dAb), ligandos e monômeros e multímeros de dAb (por exemplo, homo- ou heterodímeros) pode ser localmente administrado ao tecido pulmonar (por exemplo, ao pulmão) de um indivíduo, com o uso de qualquer método adequado. Por exemplo, um agente pode ser localmente administrado ao tecido pulmonar através de inalação ou administração intranasal. Para a inalação ou a administração intranasal, o antagonista de TNFR1 pode ser administrado com o uso de um nebulizador, inalador,

atomizador, aerossolizador, nebulizador, inalador de pó seco, inalador de dose medida, pulverizador de dose medida, nebulizador de dose medida, atomizador de dose medida, ou outros inaladores ou dispositivos de dispensação intranasal adequados. Assim, em uma forma de realização, a invenção provê um dispositivo de dispensação pulmonar contendo o antagonista de TNFR1. Em uma forma de realização, o dispositivo é um inalador ou um dispositivo de dispensação intranasal.

Em um aspecto, a invenção provê uma formulação oral contendo o antagonista de TNFR1. A formulação pode ser um tablete, pílula, cápsula, líquido ou xarope.

Em uma forma de realização, a invenção provê uma formulação pulmonar para dispensação aos pulmões, em que a formulação compreende um antagonista, polipeptídeo ou domínio variável da invenção com uma faixa de tamanho de partículas de menos do que 5 microns, por exemplo menos do que 4,5, 4, 3,5 ou 3 microns (por exemplo, quanto no tampão de Britton-Robinson, por exemplo em um pH de 6,5 a 8,0, por exemplo em um pH de 7 a 7,5, por exemplo no pH 7 ou no pH 7,5).

Em uma forma de realização, as formulações e as composições da invenção são providas em um pH de 6,5 a 8,0, por exemplo de 7 a 7,5, por exemplo de 7, por exemplo de 7,5.

Os domínios variáveis de acordo com qualquer aspecto da invenção podem ter uma T_m de pelo menos 50 °C, ou de pelo menos 55 °C, ou de pelo menos 60 °C, ou de pelo menos 65 °C, ou de pelo menos 70 °C. Um antagonista, o uso, o método, o dispositivo ou a formulação da invenção podem compreender um tal domínio variável.

Em um aspecto da invenção, os polipeptídeos, os domínios variáveis, os antagonistas, as composições ou as formulações da invenção são substancialmente estáveis após a incubação (em uma concentração de polipeptídeo ou domínio variável de 1 mg/ml) em 37 a 50 °C por 14 dias em

tampão de Britton-Robinson. Em uma forma de realização, pelo menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % do polipeptídeo, do antagonista ou do domínio variável permanecem não agregados após tal incubação em 37 graus C. Em uma forma de realização, pelo menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % do polipeptídeo ou do domínio variável permanecem monoméricos após tal incubação em 37 graus C. Em uma forma de realização, pelo menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % do polipeptídeo, do antagonista ou do domínio variável permanecem não agregados após tal incubação em 50 graus C. Em uma forma de realização, pelo menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % do polipeptídeo ou do domínio variável permanecem monoméricos após tal incubação a 50 graus C. Em uma forma de realização, nenhuma agregação dos polipeptídeos, dos domínios variáveis, dos antagonistas, é observada após qualquer uma de tais incubações. Em uma forma de realização, o pI do polipeptídeo ou domínio variável permanece imutável ou substancialmente imutável após a incubação em 37 graus C em uma concentração de polipeptídeo ou de domínio variável de 1 mg/ml no tampão de Britton-Robinson.

Em um aspecto da invenção, os polipeptídeo, os domínios variáveis, os antagonistas, as composições ou as formulações da invenção são substancialmente estáveis após a incubação (em uma concentração de polipeptídeo ou de domínio variável de 100 mg/ml) em 4 °C durante 7 dias em tampão de Britton-Robinson em um pH de 7 a 7,5 (por exemplo, em pH 7 ou pH 7,5). Em uma forma de realização, pelo menos 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 ou 99,5 % do polipeptídeo, do antagonista ou do domínio variável permanecem não agregados após tal incubação. Em uma forma de realização, pelo menos 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 ou 99,5 % do

polipeptídeo ou do domínio variável permanecem monoméricos após tal incubação. Em uma forma de realização, nenhuma agregação dos polipeptídeos, domínios variáveis, antagonistas é observada após qualquer uma de tais incubações.

5 Em um aspecto da invenção, os polipeptídeos, os domínios variáveis, os antagonistas, as composições ou as formulações da invenção são substancialmente estáveis após a nebulização (em uma concentração de polipeptídeo ou domínio variável de 40 mg/ml), por exemplo na temperatura ambiente, em 20 graus C ou em 37 °C, por 1 hora, por exemplo em um
10 nebulizador a jato, por exemplo uma cuba Pari LC+. Em uma forma de realização, pelo menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 ou 99,5 % do polipeptídeo, do antagonista ou do domínio variável permanecem não agregados após tal nebulização. Em uma forma de realização, pelo menos 65, 70, 75, 80, 85, 86,
15 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 ou 99,5 % do polipeptídeo ou do domínio variável permanecem monoméricos após tal nebulização. Em uma forma de realização, nenhuma agregação dos polipeptídeos, domínios variáveis, antagonistas, é observada após qualquer uma de tal nebulização.

20 Os domínios variáveis em conformidade com qualquer aspecto da invenção podem neutralizar a dispensação de IL-8 estimulada por TNF α em um ensaio de células MRC-5 com ND50 de 2 nM a 50 pM. Um antagonista, o uso, o método, o dispositivo ou a formulação, da invenção, podem compreender um tal domínio variável.

25 Em um aspecto, a invenção fornece um ácido nucleico isolado ou recombinante codificando um polipeptídeo compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina de acordo com qualquer aspecto da invenção, ou codificando um polipeptídeo, antagonista ou domínio variável de acordo com qualquer aspecto da invenção. Em um aspecto, a invenção

provê um vetor compreendendo o ácido nucleico. Em um aspecto, a invenção provê uma célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico ou o vetor. Em um aspecto, a invenção provê um método para produzir polipeptídeo compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina, o método compreendendo manter a célula hospedeira sob condições adequadas para expressão do referido ácido nucleico ou vetor, por meio do que um polipeptídeo que compreenda um domínio variável único de imunoglobulina seja produzido. O método pode ainda compreender isolar o polipeptídeo, o domínio variável ou o antagonista e, opcionalmente, produzir uma variante, por exemplo uma variante transformada, tendo uma afinidade e/ou ND50 melhoradas em relação ao polipeptídeo isolado, ao domínio variável ou ao antagonista. Técnicas para melhorar a afinidade de ligação do domínio variável único de imunoglobulina são conhecidas na prática, por exemplo técnicas para maturação de afinidade.

Em um aspecto, a invenção provê uma composição farmacêutica contendo um domínio variável único de imunoglobulina, polipeptídeo ou um antagonista de qualquer aspecto da invenção, e um carreador, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitáveis.

Em uma forma de realização, o domínio variável único de imunoglobulina ou o antagonista de qualquer aspecto da invenção, compreendem um domínio constante de anticorpo, por exemplo, um anticorpo Fc, opcionalmente em que o término N do Fc seja ligado (opcionalmente diretamente ligado) ao término C do domínio variável.

O polipeptídeo ou domínio variável da invenção podem ser isolados e/ou recombinantes.

Existe neste relatório descrito um método para selecionar um peptídeo ou polipeptídeo resistentes à protease. O método compreende prover um repertório de peptídeos ou polipeptídeos, combinando o repertório e uma protease sob condições adequadas para a atividade da protease, e recuperar

um peptídeo ou polipeptídeo que tenha uma atividade biológica desejada (por exemplo, ligação específica a TNFR1), por meio do que um peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease seja selecionado.

O repertório e a protease são geralmente incubados por um período de pelo menos cerca de 30 minutos. Qualquer protease desejada pode ser usada no método, tal como uma ou mais das seguintes: serina protease, cisteína protease, aspartato proteases, tiol proteases, metaloprotease matrizes, carboxipeptidase (por exemplo, carboxipeptidase A, carboxipeptidase B), tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, elastase, leucozima, pancreatina, trombina, plasmina, catepsinas (por exemplo, catepsina G), proteinase (por exemplo, proteinase 1, proteinase 2, proteinase 3), termolisina, quimosina, enteropeptidase, caspase (por exemplo, caspase 1, caspase 2, caspase 4, caspase 5, caspase 9, caspase 12, caspase 13), calpaína, ficaína, clostripaína, actinidaína, bromelaína e separase. Em formas de realização particulares, a protease é tripsina, elastase ou leucozima. A protease pode também ser fornecida por um extrato biológico, homogeneizado biológico ou preparação biológica. Se desejável, o método ainda compreende adicionar um inibidor da protease à combinação do repertório com a protease após a incubação estar completa.

Em algumas formas de realização, um peptídeo ou polipeptídeo que tenham uma atividade biológica desejada são recuperados com base em uma atividade de ligação. Por exemplo, o peptídeo ou polipeptídeo pode ser recuperado com base na ligação de um ligando genérico, tal como a proteína A, proteína G ou proteína L. A atividade de ligação pode também ser ligação específica a um ligando alvo. Ligandos alvos exemplares incluem ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, CEA, CD40, Ligando de CD40, CD56, CD38, CD138, EGF, receptor EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, FAP α , FGF-acídico, FGF-básico, fator 10 de crescimento de fibroblasto, ligando FLT3, Fractalkine (CX3C), GDNF, G-

CSF, GM-CSF, GF- β 1, albumina de soro humano, insulina, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL-1 α , IL-1 β , receptor IL-1, receptor IL-1 tipo 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inibina α , Inibina β , IP-10, fator-2 de crescimento ceratinócito (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, substância inibidora de Mülleriano, fator inibidor da colônia de monócitos, proteína atraente de monócitos, M-CSF, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, fator-1 inibidor do precursor mielóide (MPIF-1), NAP-2, Neurturina, fator do crescimento nervoso, β -NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, fator de células tronco (SCF), TARC, TGF- α , TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, fator de necrose tumoral (TNF), TNF- α , TNF- β , receptor I de TNF, receptor II de TNF, TNIL-1, TPO, VEGF, VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D, receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF, receptor 3 de VEGF, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, albumina sérica, vWF, proteínas amilóides (por exemplo, amilóide alfa), MMP12, PDK1, IgE, IL-13R α 1, IL-13Ra2, IL-15, IL-15R, IL-16, IL-17R, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-23, IL-23R, IL-25, CD2, CD4, CD11a, CD23, CD25, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD56, CD138, ALK5, EGFR, FcER1, TGFb, CCL2, CCL18, CEA, CR8, CTGF, CXCL12 (SDF-1), quimase, FGF, Furina, Endotelina-1, Eotaxinas (por exemplo, Eotaxina, Eotaxina-2, Eotaxina-3), GM-CSF, ICAM-1, ICOS, IgE, IFNa, I-309, integrinas, L-selectina, MIF, MIP4, MDC, MCP-1, MMPs, neutrófilo elastase, osteopontina, OX-40, PARC, PD-1, RANTES, SCF, SDF-1, siglec8, TARC, TGFb, Trombina, Tim-1, TNF, TRANCE, Triptase, VEGF, VLA-4, VCAM, α 4 β 7, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, alfavbeta6, alfavbeta8, cMET, CD8, vWF, proteínas amilóides (por exemplo, alfa amilóide), MMP12, PDK1 e IgE.

Em formas de realização particulares, o peptídeo ou o polipeptídeo são recuperados pelo uso de batelas.

Em algumas formas de realização, o repertório compreende um sistema de apresentação. Por exemplo, o sistema de apresentação pode ser a apresentação de bacteriófago, a apresentação de ribossoma, a compartimentalização e apresentação de emulsão, apresentação de levedura, apresentação de puromicina, apresentação bacteriana, apresentação no plasmídeo ou apresentação covalente. Sistemas de apresentação exemplares ligam a função codificadora de um ácido nucleico e as características funcionais do peptídeo ou polipeptídeo codificados pelo ácido nucleico. Em formas de realização particulares, o sistema de apresentação compreende pacotes genéticos replicáveis.

Em algumas formas de realização, o sistema de apresentação compreende a apresentação de bacteriófago. Por exemplo, o bacteriófago pode ser fd, M13, lambda, MS2 ou T7. Em formas de realização particulares, o sistema de apresentação de bacteriófago é multivalente. Em algumas formas de realização, o peptídeo ou o polipeptídeo é apresentado como uma proteína de fusão pIII.

Em outras formas de realização, o método ainda compreende amplificar o ácido nucleico codificando um peptídeo ou polipeptídeo que tenha uma atividade biológica desejada. Em formas de realização particulares, o ácido nucleico é amplificado por amplificação de fago, crescimento celular ou reação em cadeia da polimerase.

Em algumas formas de realização, o repertório é um repertório de domínios variáveis únicos de imunoglobulina. Em formas de realização particulares, o domínio variável único de imunoglobulina é um domínio variável de cadeia pesada. Em formas de realização mais particulares, o domínio variável de cadeia pesada é um domínio variável de cadeia pesada humano. Em outras formas de realização, o domínio variável único de

imunoglobulina é um domínio variável de cadeia leve. Em formas de realização particulares, o domínio variável de cadeia leve é um domínio variável de cadeia leve humano.

Em outro aspecto, é fornecido um método para selecionar um peptídeo ou polipeptídeo que liguem um ligando alvo (por exemplo, TNFR1) com alta afinidade de um repertório de peptídeos ou polipeptídeos. O método compreende prover um repertório de peptídeos ou polipeptídeos, combinando o repertório e uma protease sob condições adequadas para atividade de protease, e recuperando um peptídeo ou polipeptídeo que ligue o ligando alvo.

O repertório e a protease são geralmente incubados por um período de pelo menos cerca de 30 minutos. Qualquer protease desejada pode ser usada no método, tal como uma ou mais das seguintes: serina protease, cisteína protease, aspartato proteases, tiol proteases, metaloprotease matriz, carboxipeptidase (por exemplo, a carboxipeptidase A, a carboxipeptidase B), tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, elastase, leucozima, pancreatina, trombina, plasmina, catepsinas (por exemplo a catepsina G), proteinase (por exemplo, proteinase 1, proteinase 2, proteinase 3), termolisina, quimosina, enteropeptidase, caspase (por exemplo, caspase 1, caspase 2, caspase 4, caspase 5, caspase 9, caspase 12, caspase 13), calpaina, ficaína, clostripaina, actinidaina, bromelaina e separase. Nas formas de realização particulares, a protease é tripsina, elastase ou leucozima. A protease pode também ser fornecida por um extrato biológico, homogeneizado biológico ou preparação biológica. Se desejável, o método ainda compreende adicionar um inibidor da protease à combinação do repertório com a protease após a incubação estar completa.

O peptídeo ou polipeptídeo pode ser recuperado com base na ligação de qualquer ligando alvo desejado, tais como os ligandos alvos aqui apresentados (por exemplo o TNFR1). Em formas de realização particulares, o peptídeo ou o polipeptídeo são recuperados pelo uso de batela.

Em algumas formas de realização, o repertório compreende um sistema de apresentação. Por exemplo, o sistema de apresentação pode ser apresentação de bacteriófago, apresentação de ribossoma, compartimentalização e apresentação de emulsão, apresentação de levedura, apresentação de puromicina, apresentação bacteriana, apresentação bacteriana, apresentação no plasmídeo ou apresentação covalente. Sistemas de apresentação exemplares ligam a função codificadora de um ácido nucleico e as características funcionais do peptídeo ou polipeptídeo codificados pelo ácido nucleico. Em formas de realização particulares, o sistema de apresentação compreende pacotes genéticos replicáveis.

Em algumas formas de realização, o sistema de apresentação compreende a apresentação de bacteriófago. Por exemplo, o bacteriófago pode ser fd, M13, lambda, MS2 ou T7. Em formas de realização particulares, o sistema de apresentação de bacteriófago é multivalente. Em algumas formas de realização, o peptídeo ou o polipeptídeo é apresentado como uma proteína de fusão pIII.

Em outras formas de realização, o método ainda compreende amplificar o ácido nucleico codificando um peptídeo ou polipeptídeo que tenha uma atividade biológica desejada. Em formas de realização particulares, o ácido nucleico é amplificado por amplificação de fago, crescimento celular ou reação em cadeia da polimerase.

Em algumas formas de realização, o repertório é um repertório de domínios variáveis únicos de imunoglobulina. Em formas de realização particulares, o domínio variável único de imunoglobulina é um domínio variável de cadeia pesada. Em formas de realização mais particulares, o domínio variável de cadeia pesada é um domínio variável de cadeia pesada humano. Em outras formas de realização, o domínio variável único de imunoglobulina é um domínio variável de cadeia leve. Em formas de realização particulares, o domínio variável de cadeia leve é um domínio

variável de cadeia leve humano.

Em outro aspecto, é aqui descrito um método para produzir um repertório de peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease. O método compreende prover um repertório de peptídeos ou polipeptídeos, combinando
5 o repertório de peptídeos ou polipeptídeos e uma protease sob condições adequadas para a atividade da protease, e recuperando uma pluralidade de peptídeos ou polipeptídeos que tenham uma atividade biológica desejada, por meio do que um repertório de peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease é produzido.

10 Em algumas formas de realização, o repertório e a protease são incubados por um período de pelo menos cerca de 30 minutos. Por exemplo, a protease usada no método pode ser uma ou mais das seguintes: serina protease, cisteína protease, aspartato proteases, tiol proteases, metaloprotease matriz, carboxipeptidase (por exemplo, a carboxipeptidase A, a
15 carboxipeptidase B), tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, elastase, leucozima, pancreatina, trombina, plasmina, catepsinas (por exemplo a catepsina G), proteinase (por exemplo, proteinase 1, proteinase 2, proteinase 3), termolisina, quimosina, enteropeptidase, caspase (por exemplo, caspase 1, caspase 2, caspase 4, caspase 5, caspase 9, caspase 12, caspase 13), calpaina,
20 ficaina, clostripaina, actinidaina, bromelaina e separase. Nas formas de realização particulares, a protease é tripsina, elastase ou leucozima. A protease pode também ser fornecida por um extrato biológico, homogeneizado biológico ou preparação biológica. Se desejável, o método ainda compreende adicionar um inibidor de protease à combinação do
25 repertório com a protease após a incubação estar completa.

Em algumas formas de realização, uma pluralidade de peptídeos ou polipeptídeos que têm uma atividade biológica desejada é recuperada com base em uma atividade de ligação. Por exemplo, uma pluralidade de peptídeos ou polipeptídeos pode ser recuperada com base na

ligação de um ligando genérico, tal como a proteína A, a proteína G ou a proteína L. A atividade de ligação pode também ser ligação específica a um ligando alvo, tal como um ligando alvo descrito neste relatório. Em formas de realização particulares, uma pluralidade de peptídeos ou polipeptídeos que tenham a atividade biológica desejada, é recuperada por meio do uso de batela.

Em algumas formas de realização, o repertório compreende um sistema de apresentação. Por exemplo, o sistema de apresentação pode ser a apresentação de bacteriófago, a apresentação de ribossoma, a compartimentalização e apresentação de emulsão, apresentação de levedura, apresentação de puromicina, apresentação bacteriana, apresentação no plasmídeo ou apresentação covalente. Sistemas de apresentação exemplares ligam a função codificadora de um ácido nucleico e as características funcionais do peptídeo ou polipeptídeo codificados pelo ácido nucleico. Em formas de realização particulares, o sistema de apresentação compreende pacotes genéticos replicáveis.

Em algumas formas de realização, o sistema de apresentação compreende a apresentação de bacteriófago. Por exemplo, o bacteriófago pode ser fd, M13, lambda, MS2 ou T7. Em formas de realização particulares, o sistema de apresentação de bacteriófago é multivalente. Em algumas formas de realização, o peptídeo ou o polipeptídeo é apresentado como uma proteína de fusão pIII.

Em outras formas de realização, o método ainda compreende amplificar o ácido nucleico codificando um peptídeo ou polipeptídeo que tenha uma atividade biológica desejada. Em formas de realização particulares, o ácido nucleico é amplificado por amplificação de fago, crescimento celular ou reação em cadeia da polimerase.

Em algumas formas de realização, o repertório é um repertório de domínios variáveis únicos de imunoglobulina. Em formas de realização

particulares, o domínio variável único de imunoglobulina é um domínio variável de cadeia pesada. Em formas de realização mais particulares, o domínio variável de cadeia pesada é um domínio variável de cadeia pesada humano. Em outras formas de realização, o domínio variável único de imunoglobulina é um domínio variável de cadeia leve. Em formas de realização particulares, o domínio variável de cadeia leve é um domínio variável de cadeia leve humano.

Em outro aspecto, é aqui descrito um método para selecionar um polipeptídeo resistente à protease compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina (dAb) que ligue um ligando alvo (por exemplo, TNFR1) de um repertório. Em uma forma de realização, o método compreende prover um sistema de apresentação de fago compreendendo um repertório de polipeptídeos que compreenda um domínio variável único de imunoglobulina, combinando o sistema de apresentação de fago e uma protease selecionada do grupo consistindo de elastase, leucozima e tripsina, sob condições adequadas para a atividade de protease, e recuperando um fago que apresente um polipeptídeo contendo um domínio variável único de imunoglobulina que ligue o ligando alvo.

Em algumas formas de realização, a protease é usada em 100 µg/ml, e o sistema de apresentação de fago combinado e a protease são incubados em cerca de 37 °C, durante a noite.

Em algumas formas de realização, o fago que apresenta um polipeptídeo compreendendo o domínio variável único de imunoglobulina que liga o ligando alvo é recuperado pela ligação ao referido alvo. Em outras formas de realização, o fago que apresenta um polipeptídeo compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina que liga o ligando alvo é recuperado pelo uso de batela.

É também descrito um peptídeo ou polipeptídeo resistentes à protease isolada selecionáveis ou selecionados pelos métodos aqui descritos.

Em uma forma de realização particular, é fornecido um domínio variável único de imunoglobulina resistente à protease isolada (por exemplo, tripsina, elastase, leucozima) (por exemplo, domínio variável de cadeia pesada de anticorpo humano, domínio variável de cadeia leve de anticorpo humano) selecionável ou selecionado pelos métodos aqui descritos.

Acha-se ainda aqui descrito um ácido nucleico isolado ou recombinante que codifica um peptídeo ou polipeptídeo resistente a protease (por exemplo, o domínio variável único de imunoglobulina resistente à tripsina, elastase ou leucozima) selecionável ou selecionado pelos métodos aqui descritos, e a vetores (por exemplo, vetores de expressão) e células hospedeiras que compreendem os ácidos nucleicos.

Acha-se ainda aqui descrito um método para produzir um peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease (por exemplo, domínio variável único de imunoglobulina resistente à tripsina, elastase ou leucozima) selecionável ou selecionado pelos métodos aqui descritos, compreendendo manter uma célula hospedeira que contenha um ácido nucleico recombinante codificando o peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease sob condições adequadas para expressão, por meio do que um peptídeo ou polipeptídeo resistente a protease é produzido.

É ainda aqui descrito um peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease (por exemplo, domínio variável único de imunoglobulina resistente a tripsina, elastase ou leucozima) selecionável ou selecionado pelos métodos aqui descritos para uso em medicina (por exemplo, para terapia ou diagnóstico). É ainda descrito aqui o uso de um peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease (por exemplo, domínio variável único de imunoglobulina resistente à tripsina, elastase ou leucozima) selecionável ou selecionado pelos métodos aqui descritos para a fabricação de um medicamento para tratamento da doença. É ainda aqui descrito um método de tratamento de uma doença, compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade deste tratamento,

uma quantidade eficaz de um peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease (por exemplo, domínio variável único de imunoglobulina resistente à tripsina, elastase ou leucozima) selecionável ou selecionado pelos métodos descritos neste relatório descritivo.

5 É ainda aqui descrito um kit de diagnóstico para determinar se TNFR1 se acha presente em uma amostra ou quanto TNFR1 se acha presente em uma amostra, contendo um polipeptídeo, domínio variável de imunoglobulina (dAb) ou antagonista da invenção, e instruções para uso (por exemplo, para determinar a presença e/ou a quantidade de TNFR1 na amostra). Em algumas formas de realização, o kit ainda compreende um ou mais reagentes ancilares, tais como um tampão adequado ou reagente de detecção adequado (por exemplo, um anticorpo detectavelmente rotulado ou seu fragmento de ligação a antígeno que liga o polipeptídeo ou dAb da invenção ou um componente a ele associado ou conjugado.

15 A invenção também diz respeito a um dispositivo contendo uma superfície sólida sobre a qual um polipeptídeo, antagonista ou dAb da invenção é imobilizado, de tal modo que o polipeptídeo ou dAb imobilizados se ligam ao TNFR1. Quaisquer superfícies sólidas adequadas sobre as quais um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno possa ser imobilizado, podem ser usadas, por exemplo vidro, plásticos, carboidratos (por exemplo, 20 contas de agarose). Se desejável, o suporte pode conter ou ser modificado para conter grupos funcionais desejados para facilitar a imobilização. O dispositivo, e/ou suporte, pode ter qualquer conformação adequada, por exemplo, de uma folha, haste, tira, placa, lâmina, conta, pelota, disco, gel, 25 tubo, esfera, lasca, placa ou disco, e outros. Em algumas formas de realização, o dispositivo é uma haste graduada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma ilustração do sítio de clonagem múltipla de pDOM13 (aka pDOM33), que foi usado para preparar um repertório de

apresentação de fago.

A Figura 2 mostra vários géis Novex 10 a 20 % Tricene desenvolvidos com amostras de diferentes pontos do tempo de dAbs que foram incubadas com tripsina em 40 ug/ml em 30 °C. As amostras foram retiradas imediatamente antes da adição da tripsina, e depois em uma hora, três horas e 24 horas após a adição da tripsina. As proteínas foram manchadas com 1 x SureBlue. Os géis ilustram que tanto DOM15-10 quanto DOM15-26-501 foram significativamente digeridos durante as primeiras três horas de incubação com tripsina. A digestão de DOM15-26, DOM4-130-54 e DOM1h-131-511 apenas se tornou evidente após 24 horas de incubação com tripsina.

A Figura 3 é uma ilustração das sequências de aminoácidos de DOM1h-131-511 e 24 variantes selecionadas. Os aminoácidos que diferem da sequência precursora nos clones selecionados são realçados (aqueles que são idênticos são marcados por pontos). Os laços correspondentes a CDR1, CDR2 e CDR3 são contornados com caixas.

A Figura 4 é uma ilustração das sequências de aminoácidos das variantes selecionadas de DOM4-130-54 e 27. Os aminoácidos que diferem da sequência precursora nos clones selecionados são realçados (aqueles que são idênticos são marcados por pontos). Os laços correspondentes a CDR1, CDR2 e CDR3 são contornados com caixas.

A Figura 5 é uma ilustração das sequências de aminoácidos das variantes selecionadas de DOM15-26-555 e 21. Os aminoácidos que diferem da sequência precursora nos clones selecionados são realçados (aqueles que são idênticos são marcados por pontos). Os laços correspondentes a CDR1, CDR2 e CDR3 são contornados com caixas.

A Figura 6 é uma ilustração das sequências de aminoácidos das variantes selecionadas de DOM15-10 e 16. Os aminoácidos que diferem da sequência precursora nos clones selecionados são realçados (aqueles que são idênticos são marcados por pontos). Os laços correspondentes a CDR1,

CDR2 e CDR3 são contornados com caixas.

As Figuras 7A a 7D são traços de BIAcore mostrando a ligação de um dAb precursor, DOM1h-131-511 (Figura 7A) e três variantes dAbs, DOM1h-131-203 (Figura 7B), DOM1h-131-204 (Figura 7C) e DOM1h-131-206 (Figura 7D), ao TNFR1 imobilizado após a incubação com diferentes concentrações de tripsina (variando de 0 a 100 µg/ml) durante a noite em 37 °C. Os resultados mostram que todas as três variantes são mais resistentes do que a precursora à proteólise em altas concentrações de tripsina (100 µg/ml).

As Figuras 8A a 8C são traços de BIAcore mostrando a ligação dos dAbs DOM1h-131-511 (Figura 8A), DOM1h-131-202 (Figura 8B) e DOM1h-131-206 (Figura 8C) ao TNFR1 imobilizado após a incubação com elastase e leucosima durante a noite. Os dAbs apresentaram resistência aumentada à proteólise em comparação com a precursora em relação tanto à elastase quanto à leucosima.

A Figura 9 apresenta dois géis de 4-12 % Novex Bis-Tris desenvolvidos com amostras dos dAbs DOM1h-131-511, DOM1h-131-203, DOM1h-131-204, DOM1h-131-206, DOM1h-131-54, DOM1h-131-201 e DOM1h-131-202 antes da incubação com tripsina e amostras após a incubação com 100 µg/ml de tripsina por 1 hora, 3 horas e 24 horas.

As Figuras 10A a 10C são traços de BIAcore apresentando ligação de DOM4-130-54 (Figura 10A), DOM4-130-201 (Figura 10B) e DOM4-130-202 (Figura 10C) à proteína de fusão IL-1R1 imobilizada após incubação com diferentes concentrações de tripsina (variando de 0 a 100 µg/ml) durante a noite, em 37 °C. Os resultados mostram que ambas as variantes são mais resistentes do que sua precursora à proteólise em altas concentrações de tripsina (100 µg/ml).

As Figuras 11A a 11C são traços de BIAcore mostrando a ligação de DOM4-130-54 (Figura 11A), DOM4-130-201 (Figura 11B) e

DOM4-130-202 (Figura 11C) à proteína de fusão IL-1R1 imobilizada após a incubação com elastase e leucozima durante a noite. Os dAbs apresentaram resistência aumentada à proteólise em comparação com a precursora contra ambas as proteases testadas.

5 A Figura 12 é uma ilustração da sequência de aminoácidos de DOM15-26-555 e 6 variantes. Os aminoácidos que diferem da sequência precursora nos clones selecionados são realçados (aqueles que são idênticos são marcados por pontos).

10 As Figuras 13A e 13B são traços de BIAcore mostrando a ligação do dAb precursor, DOM15-26-555 (Figura 13A) e a variante mais resistente à protease, DOM15-26-593 (Figura 13B) ao VEGF imobilizado. O precursor e a variante foram comparados no BIAcore para ligação a hVEGF na concentração de dAb de 100 nM após incubação com tripsina em uma concentração de 200 µg/ml. A reação foi realizada por três horas ou 24 horas em 37 °C. Os resultados mostram que a variante é mais resistente do que o precursor à proteólise após 24 horas de tratamento com tripsina.

15 A Figura 14 é um gráfico mostrando os efeitos do tratamento de tripsina sobre a ligação do hVEGF pelas variantes de DOM15-26-555. Os resultados mostram claramente que todas as variantes são mais resistentes do que o precursor (DOM15-26-555) à proteólise após 24 horas de tratamento com tripsina.

20 A Figura 15 mostra dois géis de Novex 10-20 % de Tricina que foram carregados com 15 µg de amostras tratadas e não tratadas de DOM15-26-555 ou DOM15-26-593. As amostras foram removidas imediatamente antes da adição da tripsina, e depois em uma hora, três horas e 24 horas após a adição da tripsina. As proteínas foram manchadas com 1x SureBlue. Os géis ilustram que o perfil de resistência à tripsina de DOM15-26-593 variou do perfil mostrado pela experiência de BIAcore.

A Figura 16 é uma ilustração da sequência de aminoácidos de

DOM15-10 e uma variante, DOM15-10-11. Os aminoácidos que diferem da sequência precursora na variante são realçados (aqueles que são idênticos são marcados por pontos).

As Figuras 17A e 17B são traços de BIAcore mostrando a ligação do precursor, DOM15-10 (Figura 17A) e da variante, DOM15-10-11 (Figura 17B), ao VEGF imobilizado. O precursor e a variante foram comparados no BIAcore quanto à ligação de hVEGF na concentração de dAb de 100 nM após a incubação com tripsina em uma concentração de 200 µg/ml. A reação foi realizada por uma hora, três horas e 24 horas em 37 °C. Os resultados mostram que a variante é mais resistente do que o precursor à proteólise após 24 horas de tratamento com tripsina.

A Figura 18 mostra dois géis Novex 10-20 % Tricene que foram carregados com 15 µg de amostras de DOM15-10 e DOM15-10-11. As amostras foram removidas imediatamente antes da adição da tripsina, e depois em uma hora, três horas e 24 horas após a adição da tripsina. As proteínas foram manchadas com SureBlue (1x). Os resultados mostram que a atividade de ligação observada no estudo de BIAcore reflete diretamente a integridade da proteína.

As Figuras 19A a 19L ilustram as sequências de nucleotídeos de vários ácidos nucleicos codificando dAbs que são variantes de DOM1h-131-511 ou DOM4-130-54. As sequências de nucleotídeos codificam as sequências de aminoácidos apresentadas nas Figura 3 e Figura 4, respectivamente.

As Figuras 20A a 20E ilustram as sequências de nucleotídeos de vários ácidos nucleicos codificando dAbs que são variantes de DOM15-26-555 ou DOM15-10. As sequências de nucleotídeos codificam as sequências de aminoácidos apresentadas na Figura 5 e na Figura 6, respectivamente.

A Figura 21 apresenta um mapa de vetor de pDOM38.

A Figura 22 apresenta um Gel desenvolvido sobre Labchip de

proteínas DOM10-53-474 e DOM15-26-593 tratadas com tripsina em uma relação de 25:1 de dAb:tripsina em 30 °C para diferentes pontos do tempo. As flechas a proteína de comprimento completo.

5 A Figura 23 é um traço da cromatografia de exclusão de Tamanho mostrando o alto nível de pureza obtido para cada amostra após a purificação por cromatografia de MMC, seguida por troca de ânions. A UV foi monitorada em 225 nm e a coluna foi desenvolvida em 1x PBS com 10 % de etanol (v/v). O percentual de monômero foi calculado pela integração da área de pico com correção do valor de referência.

10 A Figura 24 apresenta os dados da estabilidade da protease para DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 e DOM1h-131-206.

15 A Figura 25 é um SEC que ilustra os dados de estabilidade de 14 dias de DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 e DOM1h-131-511 em tampão de Britton-Robinson em 37 e 50 °C. A concentração protéica para todos os dAbs foi de 1 mg/ml. SEC foi usado para determinar se quaisquer mudanças havia ocorrido na proteína durante o estresse térmico, e a quantidade de monômero deixada na amostra da solução em relação ao tempo = 0 (T0).

20 As Figuras 26 A a I mostram os traços de SEC apresentando o efeito do estresse térmico (37 e 50 °C) sobre DOM1h-131-511 (A a C), -202 (D a F) e -206 (G to I). É igualmente apresentado o percentual de monômero deixado em solução em relação ao T=0 em um dado ponto do tempo.

25 A Figura 27 mostra a análise de IEF de DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 e DOM1h-131-511 em estresse térmico de 24 horas, 48 horas e 7 e 14 dias. As amostras haviam sido incubadas ou em 37 ou em 50 °C em tampão de Britton-Robinson.

A Figura 28: RBA de TNFR-1 mostrando o efeito de incubação de 14 dias de DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 e DOM1h-131-511 em 50 °C. A concentração protéica foi admitida como sendo de 1 mg/ml.

Um dAb de controle negativo (VH simulado) que não se liga a antígeno é também apresentado.

5 A Figura 29 ilustra os efeitos do abastecimento A: DOM1h-131-202, B: DOM1h-131-206 e C: DOM1h-131-511 em ~100 mg/ml por 7 dias em tampão de Britton-Robinson em +4 °C. A UV foi monitorada em 280 nm.

10 A Figura 30 mostra os dados dos testes de nebulizadores dos DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 e DOM1h-131-511 no fluxo de Pari E e LC+. A concentração protéica foi de 5 mg/ml em qualquer tampão de Britton-Robinson.

A Figura 31 ilustra as mudanças relativas de percentuais nas concentrações monoméricas durante a nebulização de DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 e DOM1h-131-511 no tampão de Britton-Robinson em 5 mg/ml.

15 A Figura 32 mostra os traços de SEC de DOM1h-131-206 e DOM1h-131-511 no tampão de Britton-Robinson após a nebulização do Pari LC+.

20 A Figura 33 mostra os traços de SEC de DOM1h-131-206 durante o processo de nebulização em 1 hora em 40 mg/ml em PBS. A proteína em ambas as cubas do nebulizados e aerossol são altamente resistentes aos efeitos do cisalhamento e do estresse térmico que podem ser experimentados pelo dAb durante a nebulização.

25 A Figura 34 mostra as curvas da velocidade de sedimentação para cada uma das três proteínas conduzidas (DOM1h-131-206 e DOM1h-131-511 e DOM1h-131-202). O pico bimodal observado para a amostra de concentração inferior do DOM1h-131-206 é um artefato devido a um vazamento da amostra da célula, neste exemplo.

A Figura 35 mostra o efeito do tampão e do dispositivo sobre o tamanho das gotículas nebulizadas de GSK 1995056A (DOM1h-131-511).

Figura 36: Estabilidade de GSK 1995056A (DOM1h-131-511) após a nebulização em vários dispositivos avaliada pela formação dimérica como medido por SEC.

5 A Figura 37 mostra os testes de nebulizador de GSK1922567A (202), GSK1995057A (206) e GSK1995056A (511) no fluxo de Pari E- e LC+. A) testes no tampão de Britton-Robinson, B) testes no tampão de PEG1000/sacarose.

10 A Figura 38 representa uma curva de dose de TNF- α no ensaio de ligação do receptor de TNFR1 humano. Cada amostra foi testada como quatro réplicas.

A Figura 39 mostra a inibição por GSK1922567A (DOM1h-131-202), GSK1995057A (DOM1h-131-206) e GSK1995056A (DOM1h-131-511) no ensaio de ligação do receptor de TNFR1 humano. Cada amostra foi testada como quatro réplicas.

15 A Figura 40 ilustra a potência dos dAbs de DOM15-26 e DOM15-26-593 no RBA do VEGF.

A Figura 41 mostra a farmacocinética de DMS1529 (DOM 15-26-593) e DMS1545 (DOM15-26-501) após a administração intravenosa de uma dose de bolo único a ratos em 5 mg/mg.

20 A Figura 42a apresenta a análise SEC-MALLs (dispersão de luz de laser de múltiplos ângulos de cromatografia de exclusão de tamanho) da fusão de DMS1529 Fc (DOM 15-26-593 Fc) confirmando as propriedades monoméricas. Duas diferentes bateladas são mostradas, as quais demonstram propriedades semelhantes com respeito ao índice refrativo (isto é, concentração; linhas quebradas) e dispersão da luz (linhas cheias). A linha marcada com a flecha significa o cálculo da massa molecular.

25 A Figura 42b apresenta a análise de AUC (ultracentrifugação analítica) da fusão de DMS15-593 Fc (fusão de DOM 15-26-593 Fc) confirmando as propriedades monoméricas. Uma batelada de material foi

testada em três diferentes concentrações, aproximadamente a 0,2, 0,5 e 1,0 mg/ml em tampão de PBS. A análise do índice de sedimentação confirmou uma massa molecular de aproximadamente 80 kDa.

5 A Figura 43 mostra traços de DSC de DMS1529 (DOM15-26-593) e DOM15-26-501.

A Figura 44 é um ELISA de LIGAÇÃO a VEGF para DMS1529 (DOM 15-26-593) antes e após 10 ciclos de congelamento-descongelamento em duas diferentes bateladas de material.

10 A Figura 45 mostra a consistência do perfil de DOM 15-26-593 SEC antes e após 10 ciclos de congelamento-descongelamento.

A Figura 46 ilustra resultados de um estudo de estabilidade acelerada da fusão de DMS1529 (fusão de DOM 15-26-593 Fc; atividade demonstrando ELISA de ligação após 7 dias de incubação na temperatura apresentada.

15 A Figura 47A mostra a estabilidade de DMS1529 (DOM 15-26-593) em cinomolgo humano após 14 e 15 dias de incubação em 37 °C.

A Figura 47B mostra a estabilidade de DMS1529 (DOM 15-26-593) em soro humano após 14 e 15 dias de incubação em 37 °C.

20 A Figura 48 mostra a potência dos dAbs de DOM15-26 e DOM15-26-593 como fusões de Fc (DMS 1564 e 1529, respectivamente) no RBA de VEGF.

A Figura 49 ilustra a inibição da proliferação de células HUVEC pela fusão de DMS1529 (fusão FC de DOM15-26-593).

Figura 50: mapa do vetor pDom33.

25 A Figura 51 descreve sequências (aminoácido e nucleotídeo) de dAbs que ligam a albumina sérica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Dentro deste relatório descritivo, a invenção foi descrita, com referência às formas de realização, de uma maneira que possibilite que um

relatório descritivo claro e conciso seja escrito. É intenção, e deve ser observado, que as formas de realização possam ser variadamente combinadas ou separadas sem que se afastem da invenção.

5 A menos que de outra forma definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa de experiência normal na técnica (por exemplo, a cultura celular, a genética molecular, a química de ácido nucleico, as técnicas de hibridização e a bioquímica). Técnicas padrão são usadas para os métodos moleculares, genéticos e bioquímicos (ver, geralmente, Sambrook *et al.*, 10 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. e Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4^a Edição, John Wiley & Sons, Inc., que ficam aqui incorporados como referência) e métodos químicos.

15 Como aqui usadas, as expressões “antagonista do Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral (TNFR1)” ou “antagonista anti-TNFR1” ou coisa parecida referem-se a um agente (por exemplo, uma molécula, um composto) que liga TNFR1 e pode inibir uma função (isto é, uma ou mais) do TNFR1. Por exemplo, um antagonista do TNFR1 pode inibir a ligação do TNF α ao TNFR1 e/ou inibir a transdução de sinal mediada através do 20 TNFR1. Conseqüentemente, os processos mediados pelo TNFR1 e as respostas celulares (por exemplo, a morte celular induzida pelo TNF α em um ensaio padrão de citotoxicidade L929 podem ser inibidas com um antagonista de TNFR1.

25 Como aqui usado, “peptídeo” refere-se a cerca de dois a cerca de 50 aminoácidos que são unidos entre si através de ligações peptídicas.

Como aqui usado, “polipeptídeo” refere-se a pelo menos cerca de 50 aminoácidos que são unidos entre si por ligações peptídicas. Os polipeptídeos geralmente compreendem estrutura terciária e se desdobram em domínios funcionais.

Como aqui usado, um peptídeo ou polipeptídeo [por exemplo, um anticorpo domínio (dAb)] que seja “resistente à degradação da protease” não é substancialmente degradado por uma protease quando incubado com a protease sob condições adequadas para a atividade da protease. Um polipeptídeo (por exemplo, um dAb) não é substancialmente degradado quanto não mais do que cerca de 25 %, não mais do que cerca de 20 %, não mais do que cerca de 15 %, não mais do que cerca de 14 %, não mais do que cerca de 13 %, não mais do que cerca de 12 %, não mais do que cerca de 11 %, não mais do que cerca de 10 %, não mais do que cerca de 9 %, não mais do que cerca de 8 %, não mais do que cerca de 7 %, não mais do que cerca de 6 %, não mais do que cerca de 5 %, não mais do que cerca de 4 %, não mais do que cerca de 3 %, não mais do que cerca de 2 %, não mais do que cerca de 1 %, ou substancialmente nada da proteína é degradada por protease após a incubação com a protease por cerca de uma hora em uma temperatura adequada para a atividade de protease. Por exemplo em 37 ou 50 graus C. A degradação protéica pode ser avaliada com o uso de qualquer método adequado, por exemplo por SDS-PAGE ou por ensaio funcional (por exemplo, ligação de ligando) como aqui descrito.

Como aqui usado, “sistema de apresentação” refere-se a um sistema em que uma coleção de polipeptídeos ou peptídeos é acessível para seleção com base em uma característica desejada, tal como uma característica física, química ou funcional. O sistema de apresentação pode ser um repertório adequado de polipeptídeos ou peptídeos (por exemplo, em uma solução, imobilizada sobre um suporte adequado). O sistema de apresentação pode também ser um sistema que empregue um sistema de expressão celular (por exemplo, expressão de uma biblioteca de ácidos nucleicos, por exemplo em células transformadas, infectadas, transfectadas ou transduzidas e apresentação dos polipeptídeos codificados sobre a superfície das células) ou um sistema de expressão acelular (por exemplo, compartimentalização e

apresentação de emulsão). Sistemas de apresentação exemplares ligam a função codificadora de um ácido nucleico e as características físicas, químicas e/ou funcionais de um polipeptídeo ou peptídeo codificado pelo ácido nucleico. Quando um tal sistema de apresentação é empregado, os polipeptídeos ou peptídeos que tenham uma característica desejada física, química e/ou funcional podem ser selecionados, e um ácido nucleico codificando o polipeptídeo ou peptídeo selecionado pode ser facilmente isolado ou recuperado. Vários sistemas de apresentação que ligam a função codificadora de um ácido nucleico e as características físicas, químicas e/ou funcionais de um polipeptídeo ou peptídeo, são conhecidos na técnica, por exemplo a apresentação de bacteriófago (apresentação de fago, por exemplo apresentação de fagemídeo), apresentação de ribossoma, compartimentalização de emulsão e apresentação, apresentação de levedura, apresentação de puromicina, apresentação bacteriana, apresentação sobre plasmídeo, apresentação covalente e outros. [Ver, por exemplo, a EP 0436597 (Dyax), Patente U.S. nº 6.172.197 (McCafferty *et al.*), Patente U.S. nº 6.489.103 (Griffiths *et al.*)].

Como aqui usado, “repertório” refere-se a uma coleção de polipeptídeos ou peptídeos que são caracterizados pela diversidade das sequências de aminoácidos. Os membros individuais de um repertório podem ter aspectos comuns, tais como aspectos estruturais comuns (por exemplo, uma estrutura de núcleo comum) e/ou aspectos funcionais comuns (por exemplo, a capacidade de ligar-se a um ligando comum (por exemplo, um ligando genérico ou um ligando alvo, TNFR1)].

Como aqui usado, “funcional” descreve um polipeptídeo ou peptídeo que tenha atividade biológica, tal como atividade específica de ligação. Por exemplo, a expressão “polipeptídeo funcional” inclui um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, que liga um antígeno alvo através do sítio de ligação do seu antígeno.

Como aqui usado, “ligando genérico” refere-se a um ligando que liga uma porção substancial (por exemplo, substancialmente todos) dos membros funcionais de um dado repertório. Um ligando genérico (por exemplo, um ligando genérico comum) pode ligar muitos membros de um dado repertório, não obstante os membros possam não ter especificidade de ligação por um ligando alvo comum. Em geral, a presença de um sítio de ligação a ligando genérico funcional em um polipeptídeo (como indicado pela capacidade de ligar um ligando genérico) indica que o polipeptídeo é corretamente duplicado e funcional. Exemplos adequados de ligandos genéricos incluem superantígenos, anticorpos que ligam um epítopo expresso em uma porção substancial de membros funcionais de um repertório, etc.

“Superantígeno” é um termo da técnica que se refere a ligandos genéricos que interagem com os membros da superfamília da imunoglobulina em um sítio que seja distinto dos sítios de ligação a ligandos alvo destas proteínas. Enterotoxinas estafilocócicas são exemplos de superantígenos que interagem com os receptores das células T. Os superantígenos que ligam anticorpos incluem a Proteína G, que liga a região constante de IgG [Bjorck e Kronvall, *J. Immunol.*, 133: 969 (1984)]; a Proteína A, que liga a região constante de IgG e os domínios V_H [Forsgren e Sjoquist, *J. Immunol.*, 97: 822 (1966)]; e a Proteína L que liga os domínios V_L [Bjorck, *J. Immunol.*, 140: 1194 (1988)].

Como aqui usado, “ligando alvo” refere-se a um ligando que é especificamente ou seletivamente ligado por um polipeptídeo ou peptídeo. Por exemplo, quando um polipeptídeo é um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, o ligando alvo pode ser qualquer antígeno ou epítopo desejado. A ligação ao antígeno alvo é dependente do polipeptídeo ou do peptídeo sendo funcional.

Como aqui usado, um anticorpo refere-se a IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE ou a um fragmento (tal como um Fab, F(ab')₂, Fv, Fv ligado a

dissulfeto, scFv, anticorpo multiespecífico de conformação fechada, scFv ligado a dissulfeto, diacorpo), quer derivado de qualquer espécie que produza naturalmente um anticorpo, ou criado por tecnologia de DNA recombinante; quer isolado do soro, de células B, hibridomas, transfectomas, levedura ou

5 bactérias.

Como aqui usado, “formato de anticorpo” refere-se a qualquer estrutura polipeptídica adequada em que um ou mais domínios variáveis de anticorpo podem ser incorporados de modo a conferir especificidade de ligação para o antígeno sobre a estrutura. Uma variedade de formatos de anticorpos adequados é conhecida na técnica, tal como os anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, anticorpos de cadeia única, anticorpos biespecíficos, cadeias pesadas de anticorpos, cadeias leves de anticorpos, homodímeros e heterodímeros de cadeias pesadas e/ou cadeias leves de anticorpos, fragmentos de ligação a antígenos de qualquer

10 dos acima [por exemplo, um fragmento Fv (por exemplo, Fv de cadeia única (scFv), um Fv ligado a dissulfeto), um fragmento Fab, um fragmento Fab’, um fragmento F(ab’)₂], um domínio variável de anticorpo único [por exemplo, um dAb, V_H, V_{HH}, V_L], e versões modificadas de qualquer dos acima (por exemplo modificadas pela articulação covalente do polietileno

15 glicol ou de outro polímero adequado ou um V_{HH} humanizado).

A expressão “domínio variável único de imunoglobulina” refere-se a um domínio variável de anticorpo (V_H, V_{HH}, V_L) que especificamente se ligue a um antígeno ou epítipo independentemente de outras regiões V ou domínios. Um domínio variável único de imunoglobulina

20 pode estar presente em um formado (por exemplo, homo- ou hetero-multímero) com outras regiões variáveis ou domínios variáveis em que as outras regiões ou domínios não sejam requeridos para ligação a antígeno pelo domínio variável de imunoglobulina única (isto é, em que o domínio variável único de imunoglobulina liga antígeno independentemente dos domínios

variáveis adicionais). Um “anticorpo de domínio” ou “dAb” é o mesmo que um “domínio variável único de imunoglobulina” conforme o termo é aqui usado. Um “domínio variável de imunoglobulina única” é o mesmo que um “domínio variável único de imunoglobulina”, como a expressão é aqui usada.

5 Um “domínio variável de anticorpo único” ou um “domínio variável único de anticorpo” é o mesmo que um “domínio variável único de imunoglobulina”, como a expressão é aqui usada. Um domínio variável único de imunoglobulina é, em uma forma de realização, um domínio variável de anticorpo humano, mas também inclui os domínios variáveis de anticorpo
10 único de outras espécies tais como roedores (por exemplo, como apresentado na WO 00/29004, cujo conteúdo fica aqui incorporado como referência em sua totalidade), tubarão da enfermeira e dAbs de V_{HH} *Camelid*. Os V_{HH} *Camelid* são polipeptídeos do domínio variável único de imunoglobulina que são derivados das espécies que incluem o camelo, a lhama, alpaca,
15 dromedário e guanaco, que produzem anticorpos de cadeia pesada naturalmente destituídos de cadeias leves. O V_{HH} pode ser humanizado.

Um “domínio” é uma estrutura protéica duplicada que tem estrutura terciária independente do restante da proteína. Geralmente, os domínios são responsáveis pelas propriedades funcionais discretas das
20 proteínas, e, em muitos casos, podem ser adicionados, removidos ou transferidos para outras proteínas sem perda da função do remanescente da proteína e/ou do domínio. Um “domínio variável de anticorpo único” é um domínio de polipeptídeo duplicado compreendendo sequências características de domínios variáveis de anticorpos. Ele, portanto, inclui domínios variáveis
25 de anticorpos completos e domínios variáveis modificados, por exemplo em que uma ou mais alças tenham sido substituídas por sequências que não sejam características de domínios variáveis de anticorpos, ou domínios variáveis de anticorpos que tenham sido truncados ou compreendam extensões N- ou C-terminais, bem como fragmentos duplicados de domínios variáveis que

retenham pelo menos a atividade de ligação e a especificidade do domínio de comprimento completo.

O termo “biblioteca” refere-se a uma mistura de polipeptídeos heterogêneos ou ácidos nucleicos. A biblioteca é composta de membros, cada um dos quais tem um polipeptídeo único ou sequência de ácido nucleico. Neste ponto, “biblioteca” é sinônimo de “repertório”. As diferenças de sequências entre os membros da biblioteca são responsáveis pela diversidade presente na biblioteca. A biblioteca pode tomar a forma de uma mistura simples de polipeptídeos ou ácidos nucleicos, ou pode estar na forma de organismos ou células, por exemplo células de bactérias, vírus, animal ou planta, e outras, transformadas com uma biblioteca de ácidos nucleicos. Em uma forma de realização, cada organismo ou célula individuais contém apenas um ou um número limitado, de membros de biblioteca. Em uma forma de realização, os ácidos nucleicos são incorporados nos vetores de expressão, de modo a possibilitar a expressão dos polipeptídeos codificados pelos ácidos nucleicos. Em um aspecto, portanto, uma biblioteca pode tomar a forma de uma população de organismos hospedeiros, cada organismo contendo uma ou mais cópias de um vetor de expressão contendo um membro único da biblioteca na forma de ácido nucleico, que possa ser expresso para produzir seu membro polipeptídico correspondente. Assim, a população dos organismos hospedeiros tem o potencial para codificar um grande repertório de diversos polipeptídeos.

Uma “estrutura universal” é uma sequência de estruturas de anticorpos únicos correspondente às regiões de um anticorpo conservado na sequência como definido por Kabat (*“Sequences of Proteins of Immunological Interest”*, US Department of Health and Human Services) ou correspondente ao repertório ou estrutura de imunoglobulina da linha germinativa humana como definido por Chothia e Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 910-917. As bibliotecas e repertórios podem usar uma estrutura única, ou

um conjunto de tais estruturas, as quais tenham sido observadas permitirem a derivação virtualmente de qualquer especificidade de ligação, ainda que a variação nas regiões hipervariáveis apenas.

Como aqui usado, o termo “dose” refere-se à quantidade de ligando administrada a um paciente, toda de uma vez (dose unitária), ou em duas ou mais administrações durante um intervalo de tempo definido. Por exemplo, a dose pode referir-se à quantidade de ligando (por exemplo, ligando compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina que liga o antígeno alvo) administrada a um paciente no decurso de um dia (24 horas) (dose diária), dois dias, uma semana, duas semanas, três semanas ou um ou mais meses (por exemplo por uma administração única, ou por duas ou mais administrações). O intervalo entre as doses pode ser de qualquer quantidade de tempo desejada.

O termo “meia-vida” refere-se ao tempo levado para a concentração de soro do ligando (por exemplo, dAb, polipeptídeo ou antagonista) reduzir em 50 %, *in vivo*, por exemplo por causa da degradação do ligando e/ou depuração ou sequestro do ligando por mecanismos naturais. Os ligandos da invenção podem ser estabilizados *in vivo* e sua meia-vida pode ser aumentada pela ligação às moléculas que resistam à degradação e/ou à depuração ou ao sequestro. Tipicamente, tais moléculas são proteínas de ocorrência natural que possuem, elas próprias, uma longa meia-vida *in vivo*. A meia-vida de um ligando é aumentada se sua atividade funcional persistir, *in vivo*, por um período mais longo do que um ligando similar que não seja específico para a molécula que esteja aumentando a meia-vida crescentemente. Por exemplo, um ligando específico para a albumina sérica humana (HAS) e uma molécula alvo é comparado com o mesmo ligando em que a especificidade à HSA não esteja presente, isto é, não ligue a HSA, mas ligue outra molécula. Por exemplo, ele pode ligar-se a um terceiro alvo sobre a célula. Tipicamente, a meia-vida é aumentada em 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 210 %, 220 %, 230 %, 240 %, 250 %, 260 %, 270 %, 280 %, 290 %, 300 %, 310 %, 320 %, 330 %, 340 %, 350 %, 360 %, 370 %, 380 %, 390 %, 400 %, 410 %, 420 %, 430 %, 440 %, 450 %, 460 %, 470 %, 480 %, 490 %, 500 %, 510 %, 520 %, 530 %, 540 %, 550 %, 560 %, 570 %, 580 %, 590 %, 600 %, 610 %, 620 %, 630 %, 640 %, 650 %, 660 %, 670 %, 680 %, 690 %, 700 %, 710 %, 720 %, 730 %, 740 %, 750 %, 760 %, 770 %, 780 %, 790 %, 800 %, 810 %, 820 %, 830 %, 840 %, 850 %, 860 %, 870 %, 880 %, 890 %, 900 %, 910 %, 920 %, 930 %, 940 %, 950 %, 960 %, 970 %, 980 %, 990 %, 1000 %, 1010 %, 1020 %, 1030 %, 1040 %, 1050 %, 1060 %, 1070 %, 1080 %, 1090 %, 1100 %, 1110 %, 1120 %, 1130 %, 1140 %, 1150 %, 1160 %, 1170 %, 1180 %, 1190 %, 1200 %, 1210 %, 1220 %, 1230 %, 1240 %, 1250 %, 1260 %, 1270 %, 1280 %, 1290 %, 1300 %, 1310 %, 1320 %, 1330 %, 1340 %, 1350 %, 1360 %, 1370 %, 1380 %, 1390 %, 1400 %, 1410 %, 1420 %, 1430 %, 1440 %, 1450 %, 1460 %, 1470 %, 1480 %, 1490 %, 1500 %, 1510 %, 1520 %, 1530 %, 1540 %, 1550 %, 1560 %, 1570 %, 1580 %, 1590 %, 1600 %, 1610 %, 1620 %, 1630 %, 1640 %, 1650 %, 1660 %, 1670 %, 1680 %, 1690 %, 1700 %, 1710 %, 1720 %, 1730 %, 1740 %, 1750 %, 1760 %, 1770 %, 1780 %, 1790 %, 1800 %, 1810 %, 1820 %, 1830 %, 1840 %, 1850 %, 1860 %, 1870 %, 1880 %, 1890 %, 1900 %, 1910 %, 1920 %, 1930 %, 1940 %, 1950 %, 1960 %, 1970 %, 1980 %, 1990 %, 2000 %, 2010 %, 2020 %, 2030 %, 2040 %, 2050 %, 2060 %, 2070 %, 2080 %, 2090 %, 2100 %, 2110 %, 2120 %, 2130 %, 2140 %, 2150 %, 2160 %, 2170 %, 2180 %, 2190 %, 2200 %, 2210 %, 2220 %, 2230 %, 2240 %, 2250 %, 2260 %, 2270 %, 2280 %, 2290 %, 2300 %, 2310 %, 2320 %, 2330 %, 2340 %, 2350 %, 2360 %, 2370 %, 2380 %, 2390 %, 2400 %, 2410 %, 2420 %, 2430 %, 2440 %, 2450 %, 2460 %, 2470 %, 2480 %, 2490 %, 2500 %, 2510 %, 2520 %, 2530 %, 2540 %, 2550 %, 2560 %, 2570 %, 2580 %, 2590 %, 2600 %, 2610 %, 2620 %, 2630 %, 2640 %, 2650 %, 2660 %, 2670 %, 2680 %, 2690 %, 2700 %, 2710 %, 2720 %, 2730 %, 2740 %, 2750 %, 2760 %, 2770 %, 2780 %, 2790 %, 2800 %, 2810 %, 2820 %, 2830 %, 2840 %, 2850 %, 2860 %, 2870 %, 2880 %, 2890 %, 2900 %, 2910 %, 2920 %, 2930 %, 2940 %, 2950 %, 2960 %, 2970 %, 2980 %, 2990 %, 3000 %, 3010 %, 3020 %, 3030 %, 3040 %, 3050 %, 3060 %, 3070 %, 3080 %, 3090 %, 3100 %, 3110 %, 3120 %, 3130 %, 3140 %, 3150 %, 3160 %, 3170 %, 3180 %, 3190 %, 3200 %, 3210 %, 3220 %, 3230 %, 3240 %, 3250 %, 3260 %, 3270 %, 3280 %, 3290 %, 3300 %, 3310 %, 3320 %, 3330 %, 3340 %, 3350 %, 3360 %, 3370 %, 3380 %, 3390 %, 3400 %, 3410 %, 3420 %, 3430 %, 3440 %, 3450 %, 3460 %, 3470 %, 3480 %, 3490 %, 3500 %, 3510 %, 3520 %, 3530 %, 3540 %, 3550 %, 3560 %, 3570 %, 3580 %, 3590 %, 3600 %, 3610 %, 3620 %, 3630 %, 3640 %, 3650 %, 3660 %, 3670 %, 3680 %, 3690 %, 3700 %, 3710 %, 3720 %, 3730 %, 3740 %, 3750 %, 3760 %, 3770 %, 3780 %, 3790 %, 3800 %, 3810 %, 3820 %, 3830 %, 3840 %, 3850 %, 3860 %, 3870 %, 3880 %, 3890 %, 3900 %, 3910 %, 3920 %, 3930 %, 3940 %, 3950 %, 3960 %, 3970 %, 3980 %, 3990 %, 4000 %, 4010 %, 4020 %, 4030 %, 4040 %, 4050 %, 4060 %, 4070 %, 4080 %, 4090 %, 4100 %, 4110 %, 4120 %, 4130 %, 4140 %, 4150 %, 4160 %, 4170 %, 4180 %, 4190 %, 4200 %, 4210 %, 4220 %, 4230 %, 4240 %, 4250 %, 4260 %, 4270 %, 4280 %, 4290 %, 4300 %, 4310 %, 4320 %, 4330 %, 4340 %, 4350 %, 4360 %, 4370 %, 4380 %, 4390 %, 4400 %, 4410 %, 4420 %, 4430 %, 4440 %, 4450 %, 4460 %, 4470 %, 4480 %, 4490 %, 4500 %, 4510 %, 4520 %, 4530 %, 4540 %, 4550 %, 4560 %, 4570 %, 4580 %, 4590 %, 4600 %, 4610 %, 4620 %, 4630 %, 4640 %, 4650 %, 4660 %, 4670 %, 4680 %, 4690 %, 4700 %, 4710 %, 4720 %, 4730 %, 4740 %, 4750 %, 4760 %, 4770 %, 4780 %, 4790 %, 4800 %, 4810 %, 4820 %, 4830 %, 4840 %, 4850 %, 4860 %, 4870 %, 4880 %, 4890 %, 4900 %, 4910 %, 4920 %, 4930 %, 4940 %, 4950 %, 4960 %, 4970 %, 4980 %, 4990 %, 5000 %, 5010 %, 5020 %, 5030 %, 5040 %, 5050 %, 5060 %, 5070 %, 5080 %, 5090 %, 5100 %, 5110 %, 5120 %, 5130 %, 5140 %, 5150 %, 5160 %, 5170 %, 5180 %, 5190 %, 5200 %, 5210 %, 5220 %, 5230 %, 5240 %, 5250 %, 5260 %, 5270 %, 5280 %, 5290 %, 5300 %, 5310 %, 5320 %, 5330 %, 5340 %, 5350 %, 5360 %, 5370 %, 5380 %, 5390 %, 5400 %, 5410 %, 5420 %, 5430 %, 5440 %, 5450 %, 5460 %, 5470 %, 5480 %, 5490 %, 5500 %, 5510 %, 5520 %, 5530 %, 5540 %, 5550 %, 5560 %, 5570 %, 5580 %, 5590 %, 5600 %, 5610 %, 5620 %, 5630 %, 5640 %, 5650 %, 5660 %, 5670 %, 5680 %, 5690 %, 5700 %, 5710 %, 5720 %, 5730 %, 5740 %, 5750 %, 5760 %, 5770 %, 5780 %, 5790 %, 5800 %, 5810 %, 5820 %, 5830 %, 5840 %, 5850 %, 5860 %, 5870 %, 5880 %, 5890 %, 5900 %, 5910 %, 5920 %, 5930 %, 5940 %, 5950 %, 5960 %, 5970 %, 5980 %, 5990 %, 6000 %, 6010 %, 6020 %, 6030 %, 6040 %, 6050 %, 6060 %, 6070 %, 6080 %, 6090 %, 6100 %, 6110 %, 6120 %, 6130 %, 6140 %, 6150 %, 6160 %, 6170 %, 6180 %, 6190 %, 6200 %, 6210 %, 6220 %, 6230 %, 6240 %, 6250 %, 6260 %, 6270 %, 6280 %, 6290 %, 6300 %, 6310 %, 6320 %, 6330 %, 6340 %, 6350 %, 6360 %, 6370 %, 6380 %, 6390 %, 6400 %, 6410 %, 6420 %, 6430 %, 6440 %, 6450 %, 6460 %, 6470 %, 6480 %, 6490 %, 6500 %, 6510 %, 6520 %, 6530 %, 6540 %, 6550 %, 6560 %, 6570 %, 6580 %, 6590 %, 6600 %, 6610 %, 6620 %, 6630 %, 6640 %, 6650 %, 6660 %, 6670 %, 6680 %, 6690 %, 6700 %, 6710 %, 6720 %, 6730 %, 6740 %, 6750 %, 6760 %, 6770 %, 6780 %, 6790 %, 6800 %, 6810 %, 6820 %, 6830 %, 6840 %, 6850 %, 6860 %, 6870 %, 6880 %, 6890 %, 6900 %, 6910 %, 6920 %, 6930 %, 6940 %, 6950 %, 6960 %, 6970 %, 6980 %, 6990 %, 7000 %, 7010 %, 7020 %, 7030 %, 7040 %, 7050 %, 7060 %, 7070 %, 7080 %, 7090 %, 7100 %, 7110 %, 7120 %, 7130 %, 7140 %, 7150 %, 7160 %, 7170 %, 7180 %, 7190 %, 7200 %, 7210 %, 7220 %, 7230 %, 7240 %, 7250 %, 7260 %, 7270 %, 7280 %, 7290 %, 7300 %, 7310 %, 7320 %, 7330 %, 7340 %, 7350 %, 7360 %, 7370 %, 7380 %, 7390 %, 7400 %, 7410 %, 7420 %, 7430 %, 7440 %, 7450 %, 7460 %, 7470 %, 7480 %, 7490 %, 7500 %, 7510 %, 7520 %, 7530 %, 7540 %, 7550 %, 7560 %, 7570 %, 7580 %, 7590 %, 7600 %, 7610 %, 7620 %, 7630 %, 7640 %, 7650 %, 7660 %, 7670 %, 7680 %, 7690 %, 7700 %, 7710 %, 7720 %, 7730 %, 7740 %, 7750 %, 7760 %, 7770 %, 7780 %, 7790 %, 7800 %, 7810 %, 7820 %, 7830 %, 7840 %, 7850 %, 7860 %, 7870 %, 7880 %, 7890 %, 7900 %, 7910 %, 7920 %, 7930 %, 7940 %, 7950 %, 7960 %, 7970 %, 7980 %, 7990 %, 8000 %, 8010 %, 8020 %, 8030 %, 8040 %, 8050 %, 8060 %, 8070 %, 8080 %, 8090 %, 8100 %, 8110 %, 8120 %, 8130 %, 8140 %, 8150 %, 8160 %, 8170 %, 8180 %, 8190 %, 8200 %, 8210 %, 8220 %, 8230 %, 8240 %, 8250 %, 8260 %, 8270 %, 8280 %, 8290 %, 8300 %, 8310 %, 8320 %, 8330 %, 8340 %, 8350 %, 8360 %, 8370 %, 8380 %, 8390 %, 8400 %, 8410 %, 8420 %, 8430 %, 8440 %, 8450 %, 8460 %, 8470 %, 8480 %, 8490 %, 8500 %, 8510 %, 8520 %, 8530 %, 8540 %, 8550 %, 8560 %, 8570 %, 8580 %, 8590 %, 8600 %, 8610 %, 8620 %, 8630 %, 8640 %, 8650 %, 8660 %, 8670 %, 8680 %, 8690 %, 8700 %, 8710 %, 8720 %, 8730 %, 8740 %, 8750 %, 8760 %, 8770 %, 8780 %, 8790 %, 8800 %, 8810 %, 8820 %, 8830 %, 8840 %, 8850 %, 8860 %, 8870 %, 8880 %, 8890 %, 8900 %, 8910 %, 8920 %, 8930 %, 8940 %, 8950 %, 8960 %, 8970 %, 8980 %, 8990 %, 9000 %, 9010 %, 9020 %, 9030 %, 9040 %, 9050 %, 9060 %, 9070 %, 9080 %, 9090 %, 9100 %, 9110 %, 9120 %, 9130 %, 9140 %, 9150 %, 9160 %, 9170 %, 9180 %, 9190 %, 9200 %, 9210 %, 9220 %, 9230 %, 9240 %, 9250 %, 9260 %, 9270 %, 9280 %, 9290 %, 9300 %, 9310 %, 9320 %, 9330 %, 9340 %, 9350 %, 9360 %, 9370 %, 9380 %, 9390 %, 9400 %, 9410 %, 9420 %, 9430 %, 9440 %, 9450 %, 9460 %, 9470 %, 9480 %, 9490 %, 9500 %, 9510 %, 9520 %, 9530 %, 9540 %, 9550 %, 9560 %, 9570 %, 9580 %, 9590 %, 9600 %, 9610 %, 9620 %, 9630 %, 9640 %, 9650 %, 9660 %, 9670 %, 9680 %, 9690 %, 9700 %, 9710 %, 9720 %, 9730 %, 9740 %, 9750 %, 9760 %, 9770 %, 9780 %, 9790 %, 9800 %, 9810 %, 9820 %, 9830 %, 9840 %, 9850 %, 9860 %, 9870 %, 9880 %, 9890 %, 9900 %, 9910 %, 9920 %, 9930 %, 9940 %, 9950 %, 9960 %, 9970 %, 9980 %, 9990 %, 10000 %.

50 % ou mais. Aumentos na faixa de 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x ou mais da meia-vida são possíveis. Alternativamente, ou além disso, os aumentos na faixa de até 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 150x da meia-vida são possíveis.

5 Como aqui usado, “tamanho hidrodinâmico” refere-se ao tamanho aparente de uma molécula (por exemplo, uma molécula protéica, ligando) com base na difusão da molécula através de uma solução aquosa. A difusão, ou deslocamento, de uma proteína através da solução pode ser processada para derivar um tamanho aparente da proteína, em que o tamanho
10 é dado pelo “raio de Stokes” ou “raio hidrodinâmico” da partícula protéica. O “tamanho hidrodinâmico” de uma proteína depende tanto da massa quanto da forma (conformação), de tal modo que duas proteínas que tenham a mesma massa molecular possam ter tamanhos hidrodinâmicos diferentes com base na conformação global da proteína.

15 Como aqui referido, o termo “compete” significa que a ligação de um primeiro alvo a seu domínio de ligação alvo cognato é inibida na presença de um segundo domínio de ligação que seja específico para o referido alvo cognato. Por exemplo, a ligação pode ser estericamente inibida, por exemplo pelo bloqueio físico de um domínio de ligação ou pela alteração
20 da estrutura ou ambiente de um domínio de ligação, de tal modo que sua afinidade ou avidéz quanto a um alvo seja reduzida. Ver a WO 2006/038027 para detalhes de como realizar as experiências do ELISA de competição e do BiaCore de competição para determinar a competição entre o primeiro e o segundo domínios de ligação.

25 Os cálculos da “homologia” ou “identidade” ou “similaridade” entre duas sequências (os termos são aqui usados intercambiavelmente) são realizados como segue. As sequências são alinhadas para fins de comparação ótimos (por exemplo, os intervalos podem ser introduzidos em uma ou em ambas dentro uma primeira e uma segunda sequência de aminoácidos ou de

ácidos nucleicos para alinhamento ótimo, e sequências não homólogas podem ser desconsideradas para fins de comparação). Em uma forma de realização, o comprimento de uma sequência de referência alinhada para fins de comparação é de pelo menos 30 %, ou pelo menos 40 %, ou pelo menos 50 %, ou pelo menos 60 %, ou pelo menos 70 %, 80 %, 90 %, 100 % do comprimento da sequência de referência. Os resíduos ou nucleotídeos de aminoácido nas posições correspondentes do aminoácido ou nas posições do nucleotídeo são então comparados. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo resíduo ou nucleotídeo de aminoácido como a posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas naquela posição (como aqui usado, a “homologia” do aminoácido ou do ácido nucleico é equivalente a “identidade” do aminoácido ou do ácido nucleico). O percentual de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências, levando-se em conta o número de intervalos, e o comprimento de cada intervalo, que necessitam ser introduzidos para alinhamento ótimo das duas sequências. Os alinhamentos e a homologia, a similaridade ou identidade da sequência de aminoácidos e de nucleotídeos, como aqui definido, podem ser preparados e determinados com o uso do algoritmo BLAST 2 Sequences, com o uso de parâmetros padrão [Tatusova, T. A. *et al.*, *FEMS Microbiol Lett*, 174: 187-188 (1999)].

MÉTODOS DE SELEÇÃO

A invenção, em uma forma de realização, diz respeito a polipeptídeos e dAbs selecionados por um método de seleção de peptídeos e polipeptídeos resistentes à protease que têm uma atividade biológica desejada. Duas pressões seletivas são usadas no método para produzir um processo eficiente para selecionar polipeptídeos que sejam altamente estáveis e resistentes à degradação da protease, e que tenham atividade biológica desejada. Como aqui descrito, os peptídeos e polipeptídeos resistentes à

protease geralmente conservam a atividade biológica. Ao contrário, os peptídeos e polipeptídeos sensíveis à protease são clivados ou digeridos pela protease nos métodos aqui descritos e, portanto, perdem sua atividade biológica. Consequentemente, os peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease são geralmente selecionados com base na sua atividade biológica, tal como a atividade de ligação.

Os métodos aqui descritos proporcionam várias vantagens. Por exemplo, como apresentado e exemplificado neste relatório, os domínios variáveis, antagonistas, peptídeos ou polipeptídeos que são selecionados quanto à resistência à degradação proteolítica por uma protease (por exemplo, tripsina), são também resistentes à degradação por outras proteases (por exemplo, elastase, leucozima). Em uma forma de realização, a resistência à protease se correlaciona com uma temperatura de fusão (T_m) mais elevada do peptídeo ou do polipeptídeo. As temperaturas de fusão mais elevadas são indicativo de domínios variáveis, antagonistas, peptídeos e polipeptídeos mais estáveis. A resistência à degradação da protease também se correlaciona em uma forma de realização com ligação de alta afinidade aos ligandos alvo. Assim, os métodos aqui descritos fornecem um meio eficiente para selecionar, isolar e/ou recuperar domínios variáveis, antagonistas, peptídeos, polipeptídeos que têm uma atividade biológica desejada e que são bem adequados para usos terapêuticos e/ou diagnósticos, porque eles são resistentes à protease, e estáveis. Em uma forma de realização, a resistência à protease se correlaciona com uma PK melhorada, por exemplo melhorada através do domínio variável n, antagonista, peptídeo ou polipeptídeo que seja não resistente à protease. PK melhorada pode ser uma AUC melhorada (área sob a curva) e/ou uma meia-vida melhorada. Em uma forma de realização, a resistência à protease se correlaciona com uma estabilidade melhorada do domínio variável, antagonista, peptídeo ou polipeptídeo para cisalhamento e/ou estresse térmico e/ou propensão reduzida para agregar durante a

nebulização, por exemplo melhorada sobre um domínio variável, antagonista, peptídeo ou polipeptídeo que não seja resistente à protease. Em uma forma de realização, a resistência à protease se correlaciona com uma estabilidade de armazenagem melhorada, por exemplo melhorada através de um domínio variável, antagonista, peptídeo ou polipeptídeo que não sejam resistentes à protease. Em um aspecto, uma, duas, três, quatro ou todas as vantagens são fornecidas, as vantagens sendo resistência à degradação da protease, T_m mais elevada e ligação de alta afinidade ao ligando alvo.

Em um aspecto, é provido um método para selecionar, isolar e/ou recuperar um peptídeo ou polipeptídeo de uma biblioteca ou um repertório de peptídeos e polipeptídeos (por exemplo, um sistema de apresentação) que seja resistente à degradação por uma protease (por exemplo, uma ou mais proteases). Em uma forma de realização, o método é um método para selecionar, isolar e/ou recuperar um polipeptídeo de uma biblioteca ou um repertório de peptídeos e polipeptídeos (por exemplo, um sistema de apresentação) que seja resistente à degradação por uma protease (por exemplo, uma ou mais proteases). Geralmente, o método compreende prover uma biblioteca ou repertório de peptídeos ou polipeptídeos, combinando a biblioteca ou repertório com uma protease (por exemplo, tripsina, elastase, leucozima, pancreatina, esputo) sob condições adequadas para atividade da protease, e selecionar, isolar e/ou recuperar um peptídeo ou polipeptídeo que seja resistente à degradação pela protease e tenha uma atividade biológica desejada. Os peptídeos ou polipeptídeos que são degradados por uma protease geralmente têm atividade biológica reduzida ou perdem sua atividade biológica por causa da atividade da protease. Consequentemente, os peptídeos ou polipeptídeos que são resistentes à degradação da protease podem ser selecionados, isolados e/ou recuperados com o uso do método com base em sua atividade biológica, tal como a atividade de ligação (por exemplo, ligação de um ligando geral, ligação de um

ligando específico, ligação de um substrato), atividade catalítica ou outra atividade biológica.

A biblioteca ou repertório de peptídeos ou polipeptídeos é combinada com a protease (por exemplo, uma ou mais proteases) sob condições adequadas para atividade proteolítica da protease. Condições que são adequadas para a atividade proteolítica da protease, e preparações biológicas ou misturas que contenham atividade proteolítica, são bem conhecidas na técnica ou podem ser facilmente determinadas por uma pessoa de experiência normal na técnica. Se desejável, as condições adequadas podem ser identificadas ou otimizadas, por exemplo, pela avaliação da atividade da protease sob uma faixa de condições de pH, concentrações de proteases, temperaturas e/ou pela variação da extensão de tempo em que a biblioteca ou repertório e a protease sejam permitidos reagirem. Por exemplo, em algumas formas de realização, a relação (em uma base de mol/mol) da protease, por exemplo, tripsina, para peptídeo ou polipeptídeo (por exemplo, domínio variável) é de 800 para 80.000 (por exemplo, 8.000 para 80.000) de protease:peptídeo ou polipeptídeo, por exemplo quando 10 microgramas/ml de protease são usados, a relação de protease:peptídeo ou polipeptídeo é de 800 para 80.000; ou quando 100 microgramas/ml de protease são usados, a relação de protease:peptídeo ou polipeptídeo é de 8.000 para 80.000. Em uma forma de realização, a relação (em uma base de peso/peso, por exemplo micrograma/micrograma) de protease (por exemplo tripsina) para peptídeo ou polipeptídeo (por exemplo domínio variável) é de 1.600 para 160.000 (por exemplo, 16.000 para 160.000). Por exemplo, quando 10 microgramas/ml de protease são usados, a relação de protease:peptídeo ou polipeptídeo é de 1.600 para 160.000; ou quando 100 microgramas/ml de protease são usados, a relação de protease:peptídeo ou polipeptídeo é de 16.000 para 160.000. Em uma forma de realização, a protease é usada em uma concentração de pelo menos 100 ou 1000 microgramas/ml e a relação de protease:peptídeo ou

polipeptídeo (em uma base de mol/mol) de protease, por exemplo tripsina, para peptídeo ou polipeptídeo (por exemplo, domínio variável), é de 8.000 para 80.000 de protease:peptídeo ou polipeptídeo. Em uma forma de realização, a protease é usada em uma concentração de pelo menos 10

5 microgramas/ml e a relação de protease:peptídeo (em uma base de mol/mol) de protease, por exemplo tripsina, para peptídeo ou polipeptídeo (por exemplo, domínio variável) é de 800 para 80.000 de protease:peptídeo ou polipeptídeo. Em uma forma de realização, a relação (em uma base de peso/peso, por exemplo micrograma/micrograma) de protease (por exemplo

10 tripsina) para peptídeo ou polipeptídeo (por exemplo, domínio variável) é de 1600 para 160.000 de protease:peptídeo ou polipeptídeo, por exemplo quando C é 10 microgramas/ml; ou quando C ou C' são 100 microgramas/ml, a relação de protease:peptídeo ou polipeptídeo é de 16.000 para 160.000. Em uma forma de realização, a concentração (c ou c') é de pelo menos 100 ou

15 1000 microgramas/ml de protease. Para testar um peptídeo ou polipeptídeo individual ou isolado (por exemplo, um domínio variável de imunoglobulina), por exemplo um que já tenha sido isolado de um repertório ou biblioteca, uma protease pode ser adicionada a uma solução de peptídeo ou polipeptídeo em um tampão adequado (por exemplo, PBS) para produzir uma solução de

20 peptídeo ou polipeptídeo/protease, tal como uma solução de pelo menos cerca de 0,01 % (p/p) de protease/peptídeo ou polipeptídeo, cerca de 0,01 % a cerca de 5 % (p/p) de protease/peptídeo ou polipeptídeo, cerca de 0,05 % a cerca de 5 % (p/p) de protease/peptídeo ou polipeptídeo, cerca de 0,1 % a cerca de 5 % (p/p) de protease/peptídeo ou polipeptídeo, cerca de 0,5 % a cerca de 5 %

25 (p/p) de protease/peptídeo ou polipeptídeo, cerca de 1 % a cerca de 5 % (p/p) de protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,01 % (p/p) de protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,02 % (p/p) de protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,03 % (p/p) de protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,04 % (p/p) de

protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,05 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,06 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,07 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,08 % (p/p) de
5 protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,09 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,1 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,2 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,3 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,4 % (p/p) de
10 protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,5 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,6 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,7 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 0,8 % (p/p) de
15 protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 1 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 2 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 3 % (p/p) de
protease/peptídeo ou polipeptídeo, pelo menos cerca de 4 % (p/p) de
20 protease/peptídeo ou polipeptídeo. A mistura pode ser incubada em uma
temperatura adequada para a atividade da protease (por exemplo, a
temperatura ambiente, cerca de 37 °C) e as amostras podem ser retiradas em
intervalos de tempo (por exemplo, em 1 hora, 2 horas, 3 horas etc.). As
amostras podem ser analisadas quanto à degradação protéica com o uso de
25 qualquer método adequado, tal como a análise de SDS-PAGE ou ligação de
ligando, e os resultados podem ser usados para estabelecer um decurso de
tempo de degradação.

Qualquer protease ou proteases desejadas podem ser usadas nos métodos aqui descritos. Por exemplo, uma protease única, qualquer

combinação desejada de diferentes proteases, ou qualquer preparação biológica, extrato biológico ou homogeneizado biológico que contenha atividade proteolítica, podem ser usados. Não é necessário que a identidade da protease ou das proteases que são usadas sejam conhecidas. Exemplos

5 adequados de proteases que podem ser usadas isoladamente ou em qualquer combinação desejada incluem a serina protease, a cisteína protease, as aspartato proteases, tiol proteases, metaloprotease matriz, carboxipeptidase (por exemplo, carboxipeptidase A, carboxipeptidase B), tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, elastase, leucozima, pancreatina, trombina,

10 plasmina, catepsinas (por exemplo a catepsina G), proteinase (por exemplo, proteinase 1, proteinase 2, proteinase 3), termolisina, quimosina, enteropeptidase, caspase (por exemplo, caspase 1, caspase 2, caspase 4, caspase 5, caspase 9, caspase 12, caspase 13), calpaína, ficaína, clostripaína, actinidaína, bromelaína, separase e outros. Extratos biológicos,

15 homogeneizados e preparações adequadas que contenham atividade proteolítica incluem o sputo, o muco (por exemplo o muco gástrico, o muco nasal, o muco brônquico), a lavagem broncoalveolar, homogeneizado pulmonar, extrato pulmonar, extrato pancreático, fluido gástrico, saliva, lágrimas e outros. A protease é usada em uma quantidade adequada para que a

20 degradação proteolítica ocorra. Por exemplo, como descrito neste relatório, a protease pode ser usada em cerca de 0,01 % a cerca de 5 % (p/p, protease/peptídeo ou polipeptídeo). Quando a protease é combinada com um sistema de apresentação que compreenda um repertório de peptídeos ou polipeptídeos (por exemplo, um sistema de apresentação de fago), por

25 exemplo a protease pode ser usada em uma concentração de cerca de 10 µg/ml a cerca de 3 mg/ml, cerca de 10 µg/ml, cerca de 20 µg/ml, cerca de 30 µg/ml, cerca de 40 µg/ml, cerca de 50 µg/ml, cerca de 60 µg/ml, cerca de 70 µg/ml, cerca de 80 µg/ml, cerca de 90 µg/ml, cerca de 100 µg/ml, cerca de 200 µg/ml, cerca de 300 µg/ml, cerca de 400 µg/ml, cerca de 500 µg/ml,

cerca de 600 µg/ml, cerca de 700 µg/ml, cerca de 800 µg/ml, cerca de 900 µg/ml, cerca de 1000 µg/ml, cerca de 1,5 mg/ml, cerca de 2 mg/ml, cerca de 2,5 mg/ml ou cerca de 3 mg/ml.

A protease é incubada com a coleção de peptídeos ou polipeptídeos (biblioteca ou repertório) em uma temperatura que seja adequada para a atividade da protease. Por exemplo, a protease e a coleção de peptídeos ou polipeptídeos podem ser incubadas em uma temperatura de cerca de 20 °C a cerca de 40 °C (por exemplo na temperatura ambiente, em cerca de 20 °C, cerca de 21 °C, cerca de 22 °C, cerca de 23 °C, cerca de 24 °C, cerca de 25 °C, cerca de 26 °C, cerca de 27 °C, cerca de 28 °C, cerca de 29 °C, cerca de 30 °C, cerca de 31 °C, cerca de 32 °C, cerca de 33 °C, cerca de 34 °C, cerca de 35 °C, cerca de 36 °C, cerca de 37 °C, cerca de 38 °C, cerca de 39 °C, cerca de 40 °C). A protease e a coleção de peptídeos ou polipeptídeos são incubadas juntas por um período de tempo suficiente para que a degradação proteolítica ocorra. Por exemplo, a coleção de peptídeos ou polipeptídeos pode ser incubada juntamente com a protease por cerca de 30 minutos a cerca de 24 ou certa de 48 horas. Em alguns exemplo, a coleção de peptídeos ou polipeptídeos é incubada juntamente com a protease durante a noite, ou por pelo menos cerca de 30 minutos, cerca de 1 hora, cerca de 1,5 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas, cerca de 48 horas, ou mais.

É geralmente desejável, pelo menos no âmbito de seleção prematura (por exemplo quando um sistema de apresentação é usado), que a protease resulte em uma redução no número de clones que tenham a atividade biológica desejada que seja selecionada pelo menos por uma ordem de

grandeza, em comparação com as seleções que não incluem a incubação com a protease. Em exemplos específicos, a quantidade de protease e condições usadas nos métodos são suficientes para reduzir o número de clones recuperados em pelo menos cerca de um log (um fator de 10), pelo menos 5 cerca de 2 logs (um fator de 100), pelo menos cerca de 3 logs (um fator de 1000) ou pelo menos cerca de 4 logs (um fator de 10.000). Quantidades adequadas de protease e condições de incubação que resultem na redução desejada em clones recuperados podem ser facilmente determinadas com o uso de métodos convencionais e/ou a orientação fornecida neste relatório 10 descritivo.

A protease e a coleção de peptídeos ou polipeptídeos podem ser combinadas e incubadas com o uso de qualquer método adequado (por exemplo, *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*). Por exemplo, a protease e a coleção de peptídeos ou polipeptídeos podem ser combinadas em um recipiente 15 adequado e mantidas estacionárias, agitadas, sacudidas, turbilhonadas ou coisa parecida, em uma temperatura adequada para a atividade de protease. Se desejável, a protease e a coleção de peptídeos ou polipeptídeo pode ser combinada em um sistema *in vivo* ou *ex vivo*, tal como pela introdução da coleção de polipeptídeos (por exemplo, biblioteca ou repertório de 20 apresentação de fato) em um animal adequado (por exemplo, um camundongo), e após suficiente tempo para que a atividade de protease tenha decorrido, recuperando-se a coleção de peptídeos ou polipeptídeos. Em outro exemplo, um órgão ou tecido é perfundido com a coleção de polipeptídeos (por exemplo, uma biblioteca ou repertório de apresentação de fago), e após 25 suficiente tempo para a que a atividade de protease tenha passado, a coleção de polipeptídeos é recuperada.

Em seguida à incubação, um peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease podem ser selecionados com base em uma atividade biológica desejada, tal como uma atividade de ligação. Se desejável, um

inibidor da protease pode ser adicionado antes da seleção. Qualquer inibidor da protease adequado (ou combinação de dois ou mais inibidores da protease) que não interfira substancialmente com o método de seleção, pode ser usado. Exemplos de inibidores da protease adequados incluem α 1-anti-tripsina, α 2-macroglobulina, amastatina, antipaina, antitrombina III, aprotinina, cloridreto fluoreto 4-(2-aminoetil) benzenossulfonílico (AEBSF), fluoreto de (4-amidino-fenil)-Metano-Sulfonila (APMSF), bestatina, benzamidina, quimoestatina, 3,4-dicloroisocumarina, fluorofosfato de diisopropila (DIFP), E-64, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), elastatina, leupeptina, N-etilmaleimida, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), pepstatina, 1,10-fenantrolina, fosforamidon, inibidores da serina protease, N-tosil-L-lisina-clorometil cetona (TLCK), Na-Tosil-Phe-clorometilcetona (TPCK) e outros. Além disso, muitas preparações que contêm inibidores de várias classes de proteases são comercialmente disponíveis [por exemplo, *Roche Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*[®] (Roche Diagnostics Corporation; Indianapolis, IN, USA), o qual inibe a quimotripsina, termolisina, papaína, pronase, extrato pancreático e tripsina].

Um peptídeo ou polipeptídeo resistentes à protease podem ser selecionados com o uso de um método de seleção de atividade biológica desejado, permita que os peptídeos e polipeptídeos que tenham a atividade biológica desejada sejam distinguidos e selecionados sobre os peptídeos e polipeptídeos que não tenham a atividade biológica desejada. Geralmente, os peptídeos ou polipeptídeos que tenham sido digeridos ou clivados perdem sua atividade biológica, enquanto os peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease permanecem funcionais. Assim, ensaios adequados quanto à atividade biológica podem ser usados para selecionar peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease. Por exemplo, uma função de ligação comum (por exemplo, a ligação de um ligando geral, a ligação de um ligando específico, ou a ligação de um substrato) pode ser avaliada com o uso de um

ensaio de ligação adequado (por exemplo, ELISA, batela). Por exemplo, os polipeptídeos que ligam um ligando alvo ou um ligando genérico, tal como a proteína A, a proteína L ou um anticorpo, podem ser selecionados, isolados e/ou recuperados com o uso de batela ou com o uso de uma matriz de afinidade adequada. O uso de batela pode ser realizado pela adição de uma solução de ligando (por exemplo, ligando genérico, ligando alvo) a um vaso adequado (por exemplo, tubo, placa de Petri) e permitindo que o ligando se torne depositado ou revestido sobre as paredes do vaso. O excesso de ligando pode ser removido por lavagem e os polipeptídeos (por exemplo, uma biblioteca de apresentação de fago) podem ser adicionados ao vaso e o vaso mantido sob condições adequadas para os polipeptídeos se ligarem ao ligando imobilizado. O polipeptídeo não ligado pode ser removido por lavagem e os polipeptídeos ligados podem ser recuperados com o uso de qualquer método adequado, tal como raspagem ou redução do pH, por exemplo.

Quando um sistema de apresentação de fago seja usado, a ligação pode ser testada em um ELISA de fago. O ELISA de fago pode ser realizado de acordo com qualquer procedimento adequado. Em um exemplo, as populações de fago produzidas em cada série de seleção podem ser ensaiadas quanto à ligação por ELISA ao ligando alvo selecionado ou ligando genérico, para identificar o fago que apresente peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease. Se desejável, peptídeos ou polipeptídeos solúveis podem ser testados quanto à ligação ao ligando alvo ou ligando genérico, por exemplo por ELISA com o uso de reagentes, por exemplo em relação a um rótulo C- ou N-terminal (ver, por exemplo, Winter *et al.* (1994) *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-455 e referências nele citadas). A diversidade do fago selecionado pode também ser avaliada por eletroforese em gel de produtos da PCR (Marks *et al.* 1991, acima; Nissim *et al.* 1994, acima), sondagem (Tomlinson *et al.*, 1992) *J. Mol. Biol.* 227, 776) ou por sequenciação do vetor DNA.

Além da especificidade quanto ao TNFR1, um antagonista ou polipeptídeo (por exemplo, um ligando específico duplo) compreendendo um polipeptídeo anti-TNFR1 resistente à protease (por exemplo, domínio variável de anticorpo único) pode ter especificidade de ligação quanto a um ligando genérico ou qualquer ligando alvo desejado, tal como proteínas humanas ou animais, incluindo citocinas, fatores de crescimento, receptores de citocina, receptores do fator de crescimento, enzimas (por exemplo, proteases), cofatores para enzimas, proteínas de ligação de DNA, lipídeos e carboidratos.

Em algumas formas de realização, o peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease (por exemplo dAb) ou antagonista liga o TNFR1 no tecido pulmonar.

Quando um sistema de apresentação (por exemplo, um sistema de apresentação que ligue a função codificadora de um ácido nucleico e as características funcionais do peptídeo ou polipeptídeo codificados pelo ácido nucleico) é usado nos métodos aqui descritos, ele pode ser frequentemente vantajoso para amplificar ou aumentar o número de cópias dos ácidos nucleicos que codificam os peptídeos ou polipeptídeos selecionados. Isto provê um meio eficiente de se obter suficientes quantidades de ácidos nucleicos e/ou peptídeos ou polipeptídeos para as séries adicionais da seleção, com o uso dos métodos aqui descritos ou de outros métodos adequados, ou para preparar repertórios adicionais (por exemplo, repertórios de maturação da afinidade). Assim, em algumas formas de realização, os métodos compreendem o uso de um sistema de apresentação (por exemplo, que liga a função codificadora de um ácido nucleico e as características funcionais do peptídeo ou polipeptídeo codificados pelo ácido nucleico, tal como a apresentação de fago), e ainda compreende amplificar ou aumentar o número de cópias de um ácido nucleico que codifique um peptídeo ou polipeptídeo selecionados. Os ácidos nucleicos podem ser amplificados com o uso de quaisquer métodos adequados, tais como por amplificação de fago,

crescimento celular ou reação em cadeia da polimerase.

Os métodos aqui descritos podem ser usados como parte de um programa para isolar os peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease, por exemplo dAbs, que podem compreender, se desejável, outros métodos de seleção adequados. Nestas situações, os métodos aqui descritos podem ser empregados em qualquer ponto desejado no programa, tal como antes ou depois de outros métodos de seleção serem usados. Os métodos aqui descritos podem também ser usados para prover duas ou mais séries de seleção, como aqui descrito e exemplificado.

10 Em um exemplo, o método é para selecionar um peptídeo ou polipeptídeo, por exemplo um dAb, que seja resistente à degradação por elastase, compreendendo prover uma biblioteca ou repertório de peptídeos ou polipeptídeos, combinando a biblioteca ou repertório com elastase (ou uma preparação, extrato ou homogeneizado biológicos compreendendo elastase) sob condições adequadas para a digestão proteolítica pela elastase, e selecionando, isolando e/ou recuperando um peptídeo ou polipeptídeo que seja resistente à degradação pela elastase e tenha atividade de ligação ao TNFR1.

20 Nas formas de realização particulares, é fornecido um método para selecionar um domínio variável único de imunoglobulina (um dAb) que seja resistente à degradação pela elastase e ligue TNFR1. Nestas formas de realização, uma biblioteca ou repertório compreendendo dAbs é fornecido e combinado com elastase (ou uma preparação, extrato ou homogeneizado biológico compreendendo elastase) sob condições adequadas para digestão proteolítica pela elastase. Os dAbs resistentes à elastase são selecionados, que especificamente se ligam ao TNFR1. Por exemplo, o dAb resistente à elastase não é substancialmente degradado quando incubado em 37 °C em uma solução de elastase de 0,04 % (p/p) por um período de pelo menos cerca de 2 horas. Em uma forma de realização, o dAb resistente à elastase não é

substancialmente degradado quando incubado em 37 °C em uma solução de elastase de 0,04 % (p/p) por um período de pelo menos cerca de 12 horas. Em uma forma de realização, o dAb resistente à elastase não é substancialmente degradado quando incubado em 37 °C em uma solução de elastase de 0,04 % (p/p) por um período de pelo menos cerca de 24 horas, pelo menos cerca de 36 horas, ou pelo menos cerca de 48 horas.

Em uma forma de realização, é fornecido um método para selecionar um domínio variável único de imunoglobulina (um dAb) que é resistente à degradação pela elastase e se liga ao TNFR1. O método compreende prover um sistema de apresentação de fago compreendendo um repertório de polipeptídeos que compreende um domínio variável único de imunoglobulina, combinando o sistema de apresentação de fago (cerca de 100 µg/ml) e incubando-se a mistura em cerca de 37 °C, por exemplo durante a noite (por exemplo, em cerca de 12 a 16 horas) e depois selecionando-se o fago que apresente um dAb que especificamente ligue o TNFR1.

Em um exemplo, é fornecido um método para selecionar um peptídeo ou polipeptídeo (por exemplo, um dAb) que seja resistente à degradação pela leucosima, compreendendo prover uma biblioteca ou repertório de peptídeos ou polipeptídeos, combinando a biblioteca ou repertório com a leucosima (ou uma preparação, extrato ou homogeneizado biológicos contendo leucosima) sob condições adequadas para digestão proteolítica pela leucosima, e selecionando-se, isolando-se e/ou recuperando-se um peptídeo ou polipeptídeo que seja resistente à degradação pela leucosima e tenha atividade de ligação específica ao TNFR1.

Em formas de realização particulares, é fornecido um método para selecionar um domínio variável único de imunoglobulina (um dAb) que seja resistente à degradação pela leucosima e se ligue ao TNFR1. Nestas formas de realização, uma biblioteca ou repertório compreendendo dAbs é fornecido e combinado com leucosima (ou uma preparação, extrato ou

homogeneizado biológicos compreendendo leucozima) sob condições adequadas para digestão proteolítica pela leucozima. São selecionados os dAbs resistentes à leucozima que especificamente se ligam ao TNFR1. Por exemplo, o dAb resistente à leucozima não é substancialmente degradado quando incubado em 37 °C em uma solução de leucozima de 0,04 % (p/p) por um período de pelo menos cerca de 2 horas. Em uma forma de realização, o dAb resistente à leucozima não é substancialmente degradado quando incubado em 37 °C em uma solução de leucozima de 0,04 % (p/p) por um período de pelo menos cerca de 12 horas. Em uma forma de realização, o dAb resistente à leucozima não é substancialmente degradado quando incubado em 37 °C em uma solução de leucozima de 0,04 % (p/p) por um período de pelo menos cerca de 24 horas, de pelo menos cerca de 36 horas, ou de pelo menos cerca de 48 horas.

Em uma forma de realização, é fornecido um método para selecionar um domínio variável único de imunoglobulina (um dAb) que seja resistente à degradação pela leucozima e especificamente se ligue ao TNFR1. O método compreende prover um sistema de apresentação de fago compreendendo um repertório de polipeptídeos que compreende um domínio variável único de imunoglobulina, combinando o sistema de apresentação de fago com leucozima (cerca de 100 µg/ml) e incubando-se a mistura em cerca de 37 °C, por exemplo durante a noite (por exemplo cerca de 12 a 16 horas), e depois selecionando-se o fago que apresenta um dAb que especificamente se ligue ao TNFR1.

Em outro exemplo, é fornecido um método para selecionar um peptídeo ou polipeptídeo (por exemplo, um dAb) que seja resistente à degradação pela tripsina, compreendendo prover uma biblioteca ou repertório de peptídeos ou polipeptídeos, combinando a biblioteca ou repertório com tripsina sob condições adequadas para digestão proteolítica pela tripsina, e selecionando-se, isolando e/ou recuperando um peptídeo ou polipeptídeo que

seja resistente à degradação pela tripsina, e especificamente se ligue ao TNFR1.

Em formas de realização particulares, é fornecido um método para selecionar um domínio variável único de imunoglobulina (um dAb) que seja resistente à degradação pela tripsina e especificamente se ligue ao TNFR1. Nestas formas de realização, uma biblioteca ou repertório compreendendo dAbs é provido e combinado com tripsina (ou uma preparação, extrato ou homogeneizado biológico compreendendo tripsina) sob condições adequadas para digestão proteolítica pela tripsina. São selecionados dAbs resistentes à tripsina que se ligam ao TNFR1. Por exemplo, o dAb resistente à tripsina não é substancialmente degradado quando incubado em 37 °C em uma solução de tripsina de 0,04 % (p/p) por um período de pelo menos cerca de 2 horas. Em uma forma de realização, o dAb resistente à tripsina não é substancialmente degradado quando incubado em 37 °C em uma solução de tripsina de 0,04 % (p/p) por um período de pelo menos cerca de 3 horas. Em uma forma de realização, o dAb resistente à tripsina não é substancialmente degradado quando incubado em 37 °C em uma solução de tripsina de 0,04 % (p/p) por um período de pelo menos cerca de 4 horas, pelo menos cerca de 5 horas, pelo menos cerca de 6 horas, pelo menos cerca de 7 horas, pelo menos cerca de 8 horas, pelo menos cerca de 9 horas, pelo menos cerca de 10 horas, pelo menos cerca de 11 horas, ou pelo menos cerca de 12 horas.

Em uma forma de realização exemplar, é fornecido um método para selecionar um domínio variável único de imunoglobulina (um dAb) que seja resistente à degradação pela tripsina e especificamente se ligue ao TNFR1. O método compreende prover um sistema de apresentação de fago contendo um repertório de polipeptídeos que compreendem um domínio variável único de imunoglobulina, combinando o sistema de apresentação de fago com tripsina (100 µg/ml) e incubando-se a mistura em cerca de 37 °C,

por exemplo durante a noite (por exemplo, por cerca de 12 a 16 horas), e depois selecionando-se o fato que apresenta um dAb que especificamente ligue o TNFR1.

5 Em um aspecto, é fornecido um método para produzir um repertório de peptídeos ou polipeptídeos (por exemplo, dAbs) resistentes à protease. O método compreende prover um repertório de peptídeos ou polipeptídeos, combinando o repertório de peptídeos ou polipeptídeos e uma protease sob condições adequadas para a atividade da protease; e recuperar uma pluralidade de peptídeos ou polipeptídeos que especificamente ligam
10 TNFR1, por meio do que um repertório de peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease é produzido. As proteases, os sistemas de apresentação, as condições para a atividade da protease, e métodos para selecionar peptídeos ou polipeptídeos que sejam adequados para uso no método, são aqui descritos em relação a outros métodos.

15 Em algumas formas de realização, um sistema de apresentação (por exemplo, um sistema de apresentação que ligue a função codificadora de um ácido nucleico e as características funcionais do peptídeo ou polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico) que compreenda um repertório ou peptídeos ou polipeptídeos é usado, e o método ainda compreende amplificar ou
20 aumentar o número de cópias dos ácidos nucleicos que codificam a pluralidade de peptídeos ou polipeptídeos selecionados. Os ácidos nucleicos podem ser amplificados com o uso de qualquer método adequado, tal como por amplificação de fato, cultivo celular ou reação em cadeia da polimerase.

25 Em uma forma de realização particular, é fornecido um método de produção de um repertório de polipeptídeos resistentes à protease que compreende dAbs anti-TNFR1. O método compreende fornecer um repertório de polipeptídeos que compreenda dAbs; combinar o repertório de peptídeos ou polipeptídeos com uma protease (por exemplo tripsina, elastase, leucozima) sob condições adequadas quanto à atividade da protease; e

recuperar uma pluralidade de polipeptídeos que compreenda dAVs que tenham especificidade de ligação quanto ao TNFR1. O método pode ser usado para produzir um repertório ingênuo, ou um repertório que seja tendido para uma especificidade de ligação desejada, tal como um repertório de maturação da afinidade com base em um dAb precursor que tenha especificidade de ligação quanto ao TNFR1.

Sistemas de Apresentação de polipeptídeos

Em uma forma de realização, o repertório ou a biblioteca de peptídeos ou polipeptídeos fornecida para uso nos métodos aqui descritos, compreendem um sistema de apresentação adequado. O sistema de apresentação pode resistir à degradação pela protease (por exemplo, uma protease única ou uma combinação de proteases, e qualquer extrato biológico, homogeneizado ou preparação que contenham atividade proteolítica [por exemplo, esputo, muco (por exemplo, muco gástrico, muco nasal, muco brônquico), lavagem broncoalveolar, homogeneizado pulmonar, extrato pulmonar, extrato pancreático, fluido gástrico, saliva, lágrimas e outros). O sistema de apresentação e o elo entre o sistema de apresentação e o polipeptídeo apresentado se acha em uma forma de realização pelo menos tão resistente à protease quanto a maioria dos peptídeos ou polipeptídeos estáveis do repertório. Isto possibilita que um ácido nucleico que codifique um polipeptídeo apresentado selecionado seja facilmente isolado e/ou amplificado.

Em um exemplo, um peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease, por exemplo um dAb, pode ser selecionado, isolado e/ou recuperado de um repertório de peptídeos ou polipeptídeos que esteja em solução, ou seja covalente ou não covalentemente ligado a uma superfície adequada, tal como plástico ou vidro (por exemplo, placa microtituladora, disposição de polipeptídeo tal como uma microdisposição). Por exemplo, uma disposição de peptídeos sobre uma superfície de uma maneira que coloque cada membro

distinto da biblioteca (por exemplo, sequência de peptídeo único) em uma localização discreta, pré-definida, na disposição, pode ser usada. A identidade de cada membro da biblioteca em uma tal disposição pode ser determinada por sua localização espacial na disposição. As localizações na disposição em que as interações da ligação entre um ligando alvo, por exemplo, e os membros reativos da biblioteca ocorrem podem ser determinadas, por esse meio identificando as sequências dos membros reativos com base na localização espacial (Ver, por exemplo, a Patente U.S. nº 5.143.854, a WO 90/15070 e a WO 92/10092).

10 Em uma forma de realização, os métodos empregam um sistema de apresentação que liga a função de um ácido nucleico e as características físicas, químicas e/ou funcionais do polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico. Um tal sistema de apresentação pode compreender uma pluralidade de pacotes genéticos replicáveis, tais como bacteriófago ou células (bactérias). Em uma forma de realização, o sistema de apresentação
15 compreende uma biblioteca, tal como uma biblioteca de apresentação de bacteriófago.

Vários sistemas de apresentação de bacteriófago (por exemplo, sistemas de apresentação monovalente e de apresentação multivalente) foram
20 descritos [Ver por exemplo Griffiths *et al.*, Patente U.S. nº 6.555.313 B1 (aqui incorporado como referência); Johnson *et al.*, Patente U.S. nº 5.733.743 (aqui incorporado como referência); McCafferty *et al.*, Patente U.S. nº 5.969.108 (aqui incorporado como referência); Mulligan-Kehoe, Patente U.S. nº 5.702.892 (aqui incorporado como referência); Winter, G. *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455 (1994); Soumillion, P. *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47(2-3): 175-189 (1994); Castagnoli, L. *et al.*, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 4(2): 121-133 (2001)]. Os peptídeos ou polipeptídeos
25 apresentados em um sistema de apresentação de bacteriófago podem ser apresentados sobre qualquer bacteriófago adequado, tal como um fato

filamentoso (por exemplo, fd, M13, F1), um fago lítico (por exemplo, T4, T7, lambda), ou um fago de RNA (por exemplo, MS2), por exemplo.

5 Geralmente, uma biblioteca ou fago que apresentem um repertório de peptídeos ou polipeptídeos de fato, como proteínas de fusão com uma proteína de revestimento de fago adequada (por exemplo proteína fd pIII), são fornecidos. A proteína de fusão pode apresentar os peptídeos ou polipeptídeos na ponta da proteína de revestimento de fago ou, se desejável, em uma posição interna. Por exemplo, o peptídeo ou polipeptídeo apresentados podem estar presentes em uma posição que seja de terminal amino para o domínio 1 de pIII (Domínio 1 de pIII é também referido como N1). O polipeptídeo apresentado pode ser diretamente fundido a pIII (por exemplo, o término N do domínio 1 de pIII) ou fundido a pIII com o uso de um ligador. Se desejável, a fusão pode ainda compreender um rótulo (por exemplo o epítipo myc, rótulo His). As bibliotecas que compreendem um repertório de peptídeos ou polipeptídeos que são apresentados como proteínas de fusão com uma proteína de revestimento de fago, podem ser produzidas com o uso de quaisquer métodos adequados, tal como pela introdução de uma biblioteca de vetores de fago ou vetores de fagemídeos codificando os peptídeos ou polipeptídeos apresentados dentro de bactérias hospedeiras adequadas, e cultivando-se as bactérias resultantes para produzir fago (por exemplo, com o uso de um fago auxiliar adequado ou plasmídeo de complementação, se desejável). A biblioteca de fago pode ser recuperada da cultura, com o uso de qualquer método adequado, tal como a precipitação e centrifugação.

25 O sistema de apresentação pode compreender um repertório de peptídeos ou polipeptídeos que contenha qualquer quantidade desejada de diversidade. Por exemplo, o repertório pode conter peptídeos ou polipeptídeos que tenham sequências de aminoácidos que correspondem a polipeptídeos de ocorrência natural expressos por um organismo, grupo de organismos (por

exemplo, um repertório de sequências de dAbs de V_{HH} isolados de um *Camelid*), tecido desejado ou tipo celular desejado, ou pode conter peptídeos ou polipeptídeos que possuam sequências randômicas ou randomizadas de aminoácidos. Se desejável, os polipeptídeos podem compartilhar um núcleo ou andaime comum. Os polipeptídeos em um tal repertório ou biblioteca podem compreender regiões definidas de sequência randômicas ou randomizadas de aminoácidos e regiões de sequências comuns de aminoácidos. Em certas formas de realização, todos, ou substancialmente todos, os polipeptídeos em um repertório são de um tipo desejado, tal como uma enzima desejada (por exemplo, uma polimerase) ou um fragmento de ligação a antígeno desejado de um anticorpo (por exemplo, V_H humano ou V_L humano. Nas formas de realização, o sistema de apresentação de polipeptídeos compreende um repertório de polipeptídeos em que cada polipeptídeo compreende um domínio variável de anticorpo. Por exemplo, cada polipeptídeo no repertório pode conter um V_H , um V_L ou um Fv (por exemplo, um Fv de cadeia única).

A diversidade de sequências de aminoácidos pode ser introduzida em qualquer região desejada de um peptídeo ou polipeptídeo ou andaime com o uso de qualquer método adequado. Por exemplo, a diversidade de sequências de aminoácidos pode ser introduzida em uma região alvo, tal como uma região determinante da complementaridade de um domínio variável de anticorpo ou um domínio hidrofóbico, mediante o preparo de uma biblioteca de ácidos nucleicos que codifique os polipeptídeos diversificados com o uso de quaisquer métodos de mutagênese adequado (por exemplo, PCR de baixa fidelidade, mutagênese mediada por oligonucleotídeo ou dirigida ao sítio, diversificação com o uso dos códons NNK) ou qualquer outro método adequado. Se desejável, uma região de um polipeptídeo a ser diversificada pode ser randomizada.

O tamanho dos polipeptídeos que compõem o repertório é

largamente uma questão de escolha e o tamanho uniforme dos polipeptídeos não é necessário. Em uma forma de realização, os polipeptídeos no repertório têm uma estrutura pelo menos terciária (formam pelo menos um domínio).

Seleção/Isolamento/Recuperação

5 Um peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease (por exemplo, uma população de polipeptídeos resistentes à protease) pode ser selecionada, isolada e/ou recuperada de um repertório ou biblioteca (por exemplo, em um sistema de apresentação), com o uso de qualquer método adequado. Em uma forma de realização, um polipeptídeo resistente à protease
10 é selecionado ou isolado com base em uma característica selecionável (por exemplo, característica física, característica química, característica funcional). Características funcionais selecionáveis adequadas incluem atividades biológicas dos peptídeos ou polipeptídeos no repertório, por exemplo, ligação a um ligando genérico (por exemplo, um superantígeno), ligação a um ligando
15 alvo (por exemplo um antígeno, um epítipo, um substrato), ligação a um anticorpo (por exemplo, através de um epítipo expresso sobre um peptídeo ou polipeptídeo), e atividade catalítica (Ver, por exemplo, Tomlinson *et al.*, WO 99/20749; WO 01/57065; WO 99/58655). Em uma forma de realização, a seleção baseia-se na ligação específica ao TNFR1. Em outra forma de
20 realização, a seleção é feita na base da característica funcional selecionada para produzir um segundo repertório em que os membros sejam resistentes à protease, seguido pela seleção de um membro do segundo repertório que especificamente se liga ao TNFR1.

25 Em algumas formas de realização, o peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease é selecionado e/ou isolado de uma biblioteca ou repertório de peptídeo ou polipeptídeo em que substancialmente todos os peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease compartilham um aspecto selecionável comum. Por exemplo, o peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease pode ser selecionado de uma biblioteca ou repertório em que

substancialmente todos os peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease ligam um ligando genérico comum, ligam um ligando alvo comum, ligam (ou são ligados por) um anticorpo comum, ou possuem uma atividade catalítica comum. Este tipo de seleção é particularmente útil para preparar um repertório de peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease que se baseiam em um peptídeo ou polipeptídeo precursor que tem uma atividade biológica desejada, por exemplo quando da realização da maturação de afinidade de um domínio variável único de imunoglobulina.

A seleção baseada na ligação a um ligando genérico comum pode produzir uma coleção ou população de peptídeos ou polipeptídeos que contenham todos, ou substancialmente todos, os peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease que tenham sido componentes da biblioteca ou repertório originais. Por exemplo, os peptídeos ou polipeptídeos que ligam um ligando alvo ou um ligando genérico, tal como a proteína A, proteína L ou um anticorpo, podem ser selecionados, isolados e/ou recuperados mediante o uso de batela ou com o uso de uma matriz de afinidade adequada. O uso de batela pode ser realizado pela adição de uma solução de ligando (por exemplo, ligando genérico, ligando alvo) a um vaso adequado (por exemplo, tubo, placa de Petri) e permitindo-se que o ligando se torne depositado ou aplicado sobre as paredes do vaso. O ligando excedente pode ser removido por lavagem e os peptídeos ou polipeptídeos (por exemplo, um repertório que tenha sido incubado com protease) podem ser adicionados ao vaso e o vaso mantido sob condições adequadas para peptídeos ou polipeptídeos para ligação do ligando imobilizado. Os peptídeos ou polipeptídeos não ligados podem ser retirados por lavagem e os peptídeos ou polipeptídeos ligados podem ser recuperados com o uso de qualquer método adequado, tal como raspagem ou redução do pH, por exemplo.

As matrizes de afinidade de ligando adequadas geralmente contêm um suporte sólido ou conta (por exemplo, agarose) ao qual um

ligando seja covalente ou não covalentemente ligado. A matriz de afinidade pode ser combinada com peptídeos ou polipeptídeos (por exemplo, um repertório que tenha sido incubado com protease) usando um processo de batelada, um processo de coluna ou qualquer outro processo adequado sob condições adequadas para ligação dos peptídeos ou polipeptídeos ao ligando sobre a matriz. Os peptídeos ou polipeptídeos que não ligam a matriz de afinidade podem ser retirados por lavagem e os peptídeos ou polipeptídeos ligados podem ser eluídos e recuperados com o uso de qualquer método adequado, tal como a eluição com um tampão de pH inferior, com um agente de desnaturação brando (por exemplo, uréia), ou com um peptídeo que venha a competir para a ligação ao ligando. Em um exemplo, um ligando alvo biotilado é combinado com um repertório sob condições adequadas para peptídeos ou polipeptídeos no repertório para ligar o ligando alvo (TNFR1). Os peptídeos ou polipeptídeos ligados são recuperados com o uso de avidina ou estreptavidina imobilizadas (por exemplo, sobre uma conta).

Em algumas formas de realização, o ligando genérico é um anticorpo ou antígeno ligando seu fragmento. Anticorpos ou fragmentos de ligação a antígenos que ligam aspectos estruturais de peptídeos ou polipeptídeos que são substancialmente conservados nos peptídeos ou polipeptídeos de uma biblioteca ou repertório, são particularmente úteis como ligandos genéricos. Anticorpos ou fragmentos de ligação a antígenos adequados para uso como ligandos para isolar, selecionar e/ou recuperar peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease, podem ser monoclonais ou policlonais e podem ser preparados com o uso de qualquer método adequado.

BIBLIOTECAS/REPERTÓRIOS

Em outros aspectos, são fornecidos repertórios de peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease, bibliotecas que codificam peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease, e métodos para produzir tais bibliotecas e repertórios.

As bibliotecas que codificam e/ou contêm peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease podem ser preparadas ou obtidas com o uso de qualquer método adequado. A biblioteca pode ser projetada para codificar peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease com base em um peptídeo ou polipeptídeo de interesse (por exemplo, um peptídeo ou polipeptídeo anti-TNFR1 selecionado de uma biblioteca), ou pode ser selecionada de outra biblioteca com o uso dos métodos aqui descritos. Por exemplo, uma biblioteca enriquecida em polipeptídeos resistentes à protease pode ser preparada com o uso de um sistema de apresentação de polipeptídeo adequado.

Em um exemplo, uma biblioteca de apresentação de fago compreendendo um repertório de polipeptídeos apresentados compreendendo domínios variáveis únicos de imunoglobulina (por exemplo, V_H , V_K , V_L) é combinada com uma protease sob condições adequadas para a atividade da protease, como descrito neste relatório. Polipeptídeos resistentes à protease são recuperados com base em uma atividade biológica desejada, tal como uma atividade de ligação (por exemplo, ligando genérico de ligação, ligando alvo de ligação), por esse meio produzindo uma biblioteca de apresentação de fago enriquecida em polipeptídeos resistentes à protease. Em uma forma de realização, a recuperação é na base de ligando genérico de ligação para produzir uma biblioteca enriquecida, seguida pela seleção de um membro anti-TNFR1 dessa biblioteca com base na ligação específica ao TNFR1.

Em outro exemplo, uma biblioteca de apresentação de fago compreendendo um repertório de polipeptídeos apresentados compreendendo domínios variáveis únicos de imunoglobulina (por exemplo V_H , V_K , V_L) é primeiro examinada para identificar membros do repertório que tenham especificidade de ligação quanto a um antígeno alvo desejado (TNFR1). Uma coleção de polipeptídeos tendo a especificidade de ligação desejada é recuperada e a coleção é combinada com protease sob condições adequadas

para a atividade proteolítica, como aqui descrito. Uma coleção de polipeptídeos resistentes à protease que têm a especificidade de ligação alvo desejada é recuperada, produzindo uma biblioteca enriquecida na resistência à protease e polipeptídeos de alta afinidade. Como aqui descrito em uma forma de realização, a resistência à protease neste método de seleção se correlaciona com a ligação de alta afinidade.

Bibliotecas que codificam um repertório de um tipo desejado de polipeptídeos podem facilmente ser produzidas com o uso de qualquer método adequado. Por exemplo, uma sequência de ácido nucleico que codifique um tipo desejado de polipeptídeo (por exemplo, uma polimerase, um domínio variável de imunoglobulina) pode ser obtida e uma coleção de ácidos nucleicos que contenham, cada um, uma ou mais mutações, pode ser preparada, por exemplo pela amplificação do ácido nucleico com o uso de um sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) propenso a erro, por mutagênese química [Deng *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269: 9533 (1994)] ou com o uso de cepas bacterianas transformadores [Low *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 260:359 (1996)].

Em outras formas de realização, regiões particulares do ácido nucleico podem ser alvejadas para diversificação. Métodos para transformar posições selecionadas são igualmente bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, o uso de oligonucleotídeos mal combinados ou oligonucleotídeos degenerados, com ou sem o uso da PCR. Por exemplo, as bibliotecas de anticorpos sintéticos foram criadas pelo alvejamento de mutações às alças de ligação de antígenos. Regiões H3 e L3 de anticorpos aleatórios ou semi-aleatórios foram juntadas aos segmentos de genes da *imunoblulin V* da linha germinativa para produzir grandes bibliotecas com regiões de estrutura não transformada [Hoogenboom e Winter (1992) acima; Nissim *et al.* (1994) acima; Griffiths *et al.* (1994) acima; DeKruif *et al.* (1995) acima]. Tal diversificação foi estendida para incluir algumas, ou todas,

as outras alças de ligação a antígeno [Cramer *et al.* (1996) *Nature Med.*, 2: 100; Riechmann *et al.* (1995) *Bio/Technology*, 13: 475; Morphosys, WO 97/08320, acima]. Em outras formas de realização, regiões particulares do ácido nucleico podem ser alvejadas para diversificação, por exemplo, por uma

5 estratégia de PCR de duas etapas, empregando o produto da primeira PCR como um “mega-iniciador”. [ver, por exemplo, Landt, O. *et al.*, *Gene* 96: 125-128 (1990)]. A diversificação alvejada pode também ser realizada, por exemplo, por SOE PCR [Ver, por exemplo, Horton, R. M. *et al.*, *Gene* 77: 61-68 (1989)].

10 A diversidade de sequência nas posições selecionadas pode ser obtida pela alteração da sequência codificadora que especifica a sequência do polipeptídeo, de tal modo que vários aminoácidos possíveis (por exemplo todos os 20 ou um subconjunto destes) podem ser incorporados naquela

15 posição. Com o uso da nomenclatura de IUPAC, o códon mais versátil é o NNK, o qual codifica todos os aminoácidos, assim como o códon de parada TAG. O códon NNK pode ser usado de modo a introduzir a diversidade requerida. Outros códons que alcançam os mesmos fins são também de uso, incluindo o códon NNN, que leva à produção dos códons de parada adicionais TGA e TAA. Uma tal abordagem alvejada pode possibilitar que o espaço

20 completo da sequência em uma área alvo seja explorado.

As bibliotecas podem compreender polipeptídeos de anticorpos resistentes à protease que têm uma conformação de cadeia principal conhecida (Ver, por exemplo, Tomlinson *et al.*, WO 99/20749).

25 As bibliotecas podem ser preparadas em um plasmídeo ou vetor adequado. Como aqui usado, vetor refere-se a um elemento discreto que é usado para introduzir DNA heterólogo nas células para sua expressão e/ou replicação. Qualquer vetor adequado pode ser usado, incluindo plasmídeos (por exemplo, plasmídeos bacterianos), vetores virais ou bacteriófagos, cromossomas artificiais e vetores epissômicos. Tais vetores podem ser usados

para clonagem e mutagênese simples, ou um vetor de expressão pode ser usado para conduzir a expressão da biblioteca. Vetores e plasmídeos usualmente contêm um ou mais sítios de clonagem (por exemplo, um poliligador), uma origem de replicação e pelo menos um gene marcador selecionável. Os vetores de expressão podem ainda conter elementos para conduzir a transcrição e a translação de um polipeptídeo, tal como um elemento intensificador, promotor, sinal de terminação da transcrição, sequências de sinal, e outros. Estes elementos podem ser dispostos de uma tal maneira de modo a ser operavelmente ligado a um inserto clonado codificando um polipeptídeo, de tal forma que o polipeptídeo seja expresso e produzido quando um tal vetor de expressão seja mantido sob condições adequadas para a expressão (por exemplo, em uma célula hospedeira adequada).

Os vetores de clonagem e de expressão geralmente contêm sequências de ácido nucleico que possibilita que o vetor replique em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Tipicamente nos vetores de clonagem, esta sequência é aquela que possibilita que o vetor se replique independentemente do DNA cromossômico hospedeiro e inclui origens de replicação ou sequências autonomamente replicativas. Tais sequências são bem conhecidas quanto a uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo de 2 microns é adequada para a levedura, e várias origens virais (por exemplo SV40, adenovírus) são úteis para clonar vetores nas células de mamíferos. Geralmente, a origem de replicação não é necessária para os vetores de expressão de mamíferos, a menos que estes sejam usados nas células de mamíferos capazes de replicar altos níveis de DNA, tais como as células COS.

Os vetores de clonagem ou de expressão podem conter um gene de seleção também referido como marcador selecionável. Tais genes

marcadores codificam uma proteína necessária para a sobrevivência ou crescimento das células hospedeiras transformadas cultivadas em um meio de cultura seletiva. As células hospedeiras não transformadas com o vetor contendo o gene de seleção, portanto, não sobreviverá no meio de cultura.

5 Genes de seleção típicos codificam proteínas que conferem resistência a antibióticos e outras toxinas, por exemplo ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, complementam deficiências auxotróficas, ou fornecem nutrientes críticos não disponíveis nos meios de cultivo.

Vetores de expressão adequados podem conter vários
10 componentes, por exemplo, uma origem de replicação, um gene marcador selecionável, um ou mais elementos de controle da expressão, tais como um elemento de controle da transcrição (por exemplo, promotor, intensificador, terminador) e/ou um ou mais sinais de translação, uma sequência de sinal ou sequência condutora, e outros. Os elementos de controle da expressão e uma
15 sequência de sinal ou condutora, se presentes, podem ser fornecidos pelo vetor ou outra fonte. Por exemplo, as sequências de controle transcricionais e/ou translacionais de um ácido nucleico clonado codificando uma cadeia de anticorpos, podem ser usadas para expressão direta.

Um promotor pode ser fornecido para expressão em uma
20 célula hospedeira desejada. Os promotores podem ser constitutivos ou indutíveis. Por exemplo, um promotor pode ser operavelmente ligado a um ácido nucleico codificando um anticorpo, cadeia de anticorpos ou suas porções, de tal forma que ele dirija a transcrição do ácido nucleico. Uma variedade de hospedeiros de promotores adequados para o sistema de
25 promotores procarióticos (por exemplo, os sistemas de promotores de β -lactamase e lactose, a fosfatase alcalina, o sistema de promotores de triptofano (*trp*), os promotores *lac*, *tac*, T3, T7 para *E. coli*) e eucarióticos (por exemplo, o promotor prematuro ou tardio do vírus símio 40, o promotor de repetição do vírus do sarcoma de Rous, o promotor do citomegalovírus, o

promotor tardio do adenovírus, o promotor Eg-1a), acha-se disponível.

Além disso, os vetores de expressão tipicamente compreendem um marcador selecionável para seleção de células hospedeiras carregando o vetor, e, no caso de um vetor de expressão replicável, uma origem de replicação. Genes codificando produtos que conferem resistência a antibióticos ou a medicamentos são marcadores selecionáveis comuns e podem ser usados em células procarióticas [por exemplo, o gene de β lactamase (resistência à ampicilina), o gene *Ter* para resistência à tetraciclina] e em células eucarióticas [por exemplo, neomicina (G418 ou feneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina, ou genes de resistência à higromicina). Os genes marcadores da diidrofolato redutase permitem a seleção com metotrexato em uma variedade de hospedeiros. Genes codificando o produto de genes dos marcadores auxotróficos do hospedeiro (por exemplo, *LEU2*, *URA3*, *HIS3*) são frequentemente usados como marcadores selecionáveis na levedura. O uso dos vetores virais (por exemplo, baculovírus) ou de fago, e vetores que são capazes de integrar-se no genoma da célula hospedeira, tais como vetores retrovirais, são também considerados.

Vetores de expressão adequados para expressão em células procarióticas (por exemplo, células bacterianas tais como *E. coli*) ou de mamíferos incluem, por exemplo, um vetor pET (por exemplo, pET-12a, pET-36, pET-37, pET-39, pET-40, Novagen e outros), um vetor de fago (por exemplo, pCANTAB 5 E, Pharmacia), pRIT2T (vetor de fusão da Proteína A, Pharmacia), pCDM8, pCDNA1,1/amp, pcDNA3,1, pRc/RSV, pEF-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pCMV-SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1 (Stratagene, La Jolla, CA), pCDEF3 [Goldman, L. A. *et al.*, *Biotechniques*, 21: 1013-1015 (1996)], pSVSPORT (GibcoBRL, Rockville, MD), pEF-Bos [Mizushima, S. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 18: 5322 (1990)] e outros. Vetores de expressão que são adequados para uso em vários hospedeiros de expressão, tais como as células procarióticas (*E. coli*), células de insetos (células de *Drosophila*

Schnieder S2, Sf9), levedura (*P. methanolica*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*) e células de mamíferos (por exemplo, células COS), acham-se disponíveis.

Exemplos de vetores são os vetores de expressão que possibilitam a expressão de uma sequência de nucleotídeos correspondente a um membro da biblioteca de polipeptídeos. Assim sendo, a seleção com ligandos genéricos e/ou alvos pode ser realizada por propagação e expressão separadas de um clone único expressando o membro da biblioteca de polipeptídeos. Como descrito acima o sistema de apresentação de seleção pode ser de apresentação de bacteriófago. Assim, os vetores fagos ou fagemídeos podem ser usados. Vetores de exemplo são os vetores fagemídeos que têm uma origem de replicação de *E. coli* (para replicação de filamento duplo) e também uma origem de fago de replicação (para a produção de DNA de filamento único). A manipulação e a expressão de tais vetores são bem conhecidas na técnica [Hoogenboom e Winter (1992) acima; Nissim *et al.* (1994) acima]. Resumidamente, o vetor pode conter um gene de β -lactamase para conferir seletividade sobre o fagemídeo e um promotor lac a montante de um cassete de expressão que possa conter uma sequência condutora adequada, um sítio de clonagem múltiplo, um ou mais rótulos peptídicos, um ou mais códons de parada TAG e a proteína de fago pIII. Assim, com o uso de várias cepas de *E. coli* supressoras e não supressoras, e com a adição de glicose, isopropil tio- β -D-galactosídeo (IPTG) ou um fato auxiliar, tal como VCS M13, o vetor é capaz de replicar como um plasmídeo sem nenhuma expressão, produzir grandes quantidades do membro da biblioteca de polipeptídeos apenas ou fago do produto, algum dos quais contenham pelo menos uma cópia da fusão do polipeptídeo-pIII sobre sua superfície.

As bibliotecas e repertórios aqui descritos podem conter formatos de anticorpos. Por exemplo, o polipeptídeo contido dentro das bibliotecas e dos repertórios pode ser domínios de V_H ou V_L completamente separados, qualquer dos quais sendo ou modificado ou não modificado.

Fragmentos scFv, bem como outros polipeptídeos de anticorpos, podem ser facilmente produzidos com o uso de qualquer método adequado. Vários métodos de engenharia de anticorpos adequados são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um scFv pode ser formado pela ligação de ácidos nucleicos codificando dois domínios variáveis com um oligonucleotídeo adequado que codifique um peptídeo ligador apropriado, tal como (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ ou outros peptídeos ligadores adequados. O ligador conecta em ponte a extremidade C-terminal da primeira região V e a extremidade N-terminal da segunda região V. Técnicas semelhantes para a construção de outros formados de anticorpos, tais como os fragmentos Fv, Fab e F(ab)₂, podem ser usadas. Para formatar fragmentos Fab e F(ab)₂, os polipeptídeos V_H e V_L podem ser combinados com segmentos de região constante, os quais podem ser isolados de genes redispuestos, genes C da linha germinativa, ou sintetizados dos dados das sequências de anticorpos. Uma biblioteca ou repertório aqui descritos podem ser uma biblioteca ou repertório V_H ou V_L.

Os polipeptídeos compreendendo um domínio variável resistente à protease podem compreender um sítio de ligação de ligando alvo (TNFR1) e um sítio de ligação do ligando genérico. Em certas formas de realização, o sítio de ligação a ligando genérico é um sítio de ligação para um superantígeno, tal como a proteína A, a proteína L ou a proteína G. Os domínios variáveis pode basear-se em qualquer domínio variável desejado, por exemplo um V_H humano (por exemplo V_H 1a, V_H 1b, V_H 2, V_H 3, V_H 4, V_H 5, V_H 6), um V_λ humano (por exemplo, V_λI, V_λII, V_λIII, V_λIV, V_λV, V_λVI ou V_κ1) ou um V_κ humano (por exemplo, V_κ2, V_κ3, V_κ4, V_κ5, V_κ6, V_κ7, V_κ8, V_κ9 ou V_κ10) ou um Camelídeo V_{HH}, opcionalmente que tenha sido humanizado.

ÁCIDOS NUCLEICOS, CÉLULAS HOSPEDEIRAS E
MÉTODOS PARA PRODUZIR POLIPEPTÍDEOS RESISTENTES À
PROTEASE

A invenção diz respeito a ácidos nucleicos isolados e/ou recombinantes codificando peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease, por exemplo que sejam selecionáveis ou selecionados pelos métodos aqui descritos.

5 Os ácidos nucleicos referidos neste relatório como “isolados” são ácidos nucleicos que foram desligados de outro material (por exemplo, outros ácidos nucleicos tais como DNA, cDNA e/ou RNA genômicos) em seu ambiente original (por exemplo, nas células ou em uma mistura de ácidos nucleicos tal como uma biblioteca). Um ácido nucleico isolado pode ser
10 isolado como parte de um vetor (por exemplo, um plasmídeo).

Os ácidos nucleicos aqui referidos como “recombinantes” são ácidos nucleicos que foram produzidos por metodologia de DNA recombinante, incluindo métodos que contam com a recombinação artificial tal como a clonagem em um vetor ou cromossoma, com o uso, por exemplo,
15 de enzimas de restrição, recombinação homóloga, vírus etc., e ácidos nucleicos preparados com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR).

A invenção também diz respeito a uma célula hospedeira recombinante que compreende um (um ou mais) ácido nucleico recombinante ou construção de expressão compreendendo um ácido nucleico codificando
20 um peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease, por exemplo um peptídeo ou polipeptídeo selecionável ou selecionado pelos métodos aqui descritos. É também fornecido um método de preparar um peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease, compreendendo manter uma célula hospedeira recombinante da invenção sob condições apropriadas para expressão de um
25 peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease. O método pode ainda compreender a etapa de isolar ou recuperar o peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease, se desejável.

Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico (isto é, uma ou mais moléculas de ácido nucleico) codificando um peptídeo ou polipeptídeo

resistente à protease, ou uma construção de expressão (isto é, uma ou mais construções) compreendendo tal(is) molécula(s) de ácido nucleico, pode ser introduzida em uma célula hospedeira adequada para criar uma célula hospedeira recombinante com o uso de qualquer método apropriado à célula hospedeira selecionada (por exemplo, transformação, transfecção, eletroporação, infecção), de tal modo que a(s) molécula(s) de ácido nucleico sejam operavelmente ligadas a um ou mais elementos de controle da expressão (por exemplo, em um vetor, em uma construção criada por processos na célula, integrado no genoma da célula hospedeira). A célula hospedeira recombinante resultante pode ser mantida sob condições adequadas para expressão (por exemplo na presença de um indutor, em um animal adequado, em meios de cultura adequados suplementados com sais apropriados, fatores de crescimento, antibióticos, suplementos nutritivos, etc.), por meio do que o peptídeo ou polipeptídeo codificado seja produzido. Se desejável, o peptídeo ou polipeptídeo codificado pode ser isolado ou recuperado (por exemplo do animal, da célula hospedeira, do meio, do leite). Este processo inclui a expressão em uma célula hospedeira de um animal transgênico (ver, por exemplo, a WO 92/03918, GenPharm International).

O peptídeo ou polipeptídeo resistente à protease selecionado pelo método aqui descrito, podem também ser produzidos em um sistema de expressão *in vitro* adequado, por síntese química ou por qualquer outro método adequado. Assim, a presente invenção leva em conta os peptídeos ou polipeptídeos resistentes à protease.

POLIPEPTÍDEOS, dAbs E ANTAGONISTAS

Como aqui descrito e exemplificado, dAbs da invenção resistentes à protease geralmente se ligam ao seu ligando com alta afinidade. Assim, em outro aspecto, é fornecido um método para selecionar, isolar e/ou recuperar um polipeptídeo ou dAb da invenção que ligue o TNFR1 com alta afinidade. Geralmente, o método compreende prover uma biblioteca ou

repertório de peptídeos ou polipeptídeos (por exemplo, dAbs), combinando a biblioteca ou repertório com uma protease (por exemplo, tripsina, elastase, leucozima, pancreatina, esputo) sob condições adequadas para a atividade da protease, e selecionar, isolar e/ou recuperar um peptídeo ou polipeptídeo que
5 ligue um ligando (por exemplo, ligando alvo).

Tendo em vista a biblioteca ou o repertório terem sido expostos à protease sob condições em que os peptídeos ou polipeptídeos sensíveis à protease sejam digeridos, a atividade de protease pode eliminar os polipeptídeos menos estáveis que tenham baixa afinidade de ligação, e por
10 esse meio produzir uma coleção de peptídeos ou polipeptídeos de ligação de alta afinidade. Por exemplo, o polipeptídeo ou dAb da invenção pode ligar o TNFR1 com uma afinidade [K_D ; $K_D = K_{\text{desligado}}(k_d)/K_{\text{ligado}}(k_a)$ como determinado por ressonância de plásmon superficial] de 1 μM ou mais intensa, ou cerca de 500 nM a cerca de 0,5 pM. Por exemplo, o polipeptídeo
15 ou dAb da invenção pode ligar o TNFR1 com uma afinidade de cerca de 500 nM, cerca de 100 nM, cerca de 10 nM, cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, cerca de 10 pM, cerca de 1 pM ou cerca de 0,5 pM.

Não obstante não estejamos ligados a qualquer teoria particular acredita-se que os peptídeos e os polipeptídeos que sejam
20 resistentes às proteases tenham uma entropia inferior e/ou uma energia de estabilização superior. Assim, a correlação entre a resistência à protease e a ligação de alta afinidade pode ser relacionada à compacidade e à estabilidade das superfícies dos peptídeos e polipeptídeos e dAbs selecionados pelo método aqui descrito.

25 Em uma forma de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista da invenção inibem a ligação do TNF-alfa ao Receptor do TNF-alfa (receptor p55) com uma concentração inibidora 50 (IC50) de, ou de cerca de, 500 nM a 50 pM, ou 100 nM a 50 pM, ou 10 nM a 100 pM, ou 1 nM a 100 pM; por exemplo, 50 nM ou menos, ou 5 nM ou menos, ou 500 pM ou

menos, ou 200 pM ou menos, ou 100 pM ou menos.

Em certas formas de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista especificamente se ligam ao TNFR1, por exemplo ao TNFR1 humano, e se dissocia do TNFR1 humano com uma constante de dissociação (K_D) de 300 nM a 1pM ou 300 nM a 5 pM ou 50 nM a 1 pM ou 50 nM a 5pM ou 50 nM a 20 pM ou cerca de 10 pM ou cerca de 15 pM ou cerca de 20 pM como determinado pela ressonância de plásmon superficial. Em certas formas de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista especificamente se ligam ao TNFR1, por exemplo TNFR1 humano, e se dissocia do TNFR1 humano com índice $K_{desligado}$ constante de $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ou $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, como determinado pela ressonância de plásmon superficial. Em certas formas de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista especificamente ligam TNFR1, por exemplo TNFR1 humano, com um K_{ligado} de $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ou $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $1 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ou cerca de $1 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ou cerca de $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Em uma forma de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista ligam especificamente TNFR1, por exemplo TNFR1 humano, e dissociam-se do TNFR1 humano com uma contante de dissociação (K_D) e um $K_{desligado}$ como definido neste parágrafo. Em uma forma de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista especificamente ligam TNFR1, por exemplo TNFR1 humano, e dissociam-se do TNFR1 humano com uma constante de dissociação (K_D) e uma K_{ligado} como definido neste parágrafo. Em algumas formas de realização, o polipeptídeo ou dAb especificamente ligam TNFR1 (por exemplo TNFR1 humano) com o K_D e/ou $K_{desligado}$ e/ou K_{ligado} como citado neste parágrato, e compreendem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos, ou pelo menos cerca de, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (mostrada na Figura 3).

O polipeptídeo, dAb ou antagonista podem ser expressos nas espécies de *E. coli* ou de *Pichia* (por exemplo, *P. pastoris*). Em uma forma de realização, o ligando ou monômero de dAb é secretado em uma quantidade de pelo menos cerca de 0,5 mg/litro, quando expresso nas espécies *E. coli* ou *Pichia* (por exemplo, *P. pastoris*). Não obstante, os ligandos e monômeros de dAb aqui descritos podem ser secretáveis quando expressos nas espécies de *E. coli* ou de *Pichia* (por exemplo, *P. pastoris*). eles podem ser produzidos com o uso de qualquer método adequado, tais como os métodos químicos sintéticos ou métodos de produção biológica que não empreguem as espécies de *E. coli* ou de *Pichia*.

Em algumas formas de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista não compreendem um domínio variável de imunoglobulina *Camelídeo*, ou um ou mais aminoácidos da estrutura que sejam únicos para os domínios variáveis de imunoglobulina codificados pelos segmentos de genes de anticorpos da linha germinativa *Camelídea*, por exemplo nas posições 108, 37, 44 e/ou 47.

Os antagonistas de TNFR1 de acordo com a invenção podem ser monovalentes ou multivalentes. Em algumas formas de realização, o antagonista é monovalente e contém um sítio de ligação que interage com TNFR1, o sítio de ligação fornecido por um polipeptídeo ou dAb da invenção. Os antagonistas monovalentes ligam um TNFR1 e podem não induzir o encadeamento cruzado ou agrupamento de TNFR1 sobre a superfície das células, o que pode levar à ativação do receptor e da transdução de sinal.

Em outras formas de realização, o antagonista de TNFR1 é multivalente. Os antagonistas multivalentes de TNFR1 podem conter duas ou mais cópias de um sítio de ligação particular para TNFR1 ou conter dois ou mais sítios de ligação diferentes que ligam TNFR1, pelo menos um dos sítios de ligação sendo fornecido por um polipeptídeo ou dAb da invenção. Por exemplo, como aqui descrito, o antagonista de TNFR1 pode ser um dímero,

trímero ou multímero compreendendo duas ou mais cópias de um polipeptídeo ou dAb particulares da invenção que ligue o TNFR1, ou dois ou mais diferentes polipeptídeos ou dAbs da invenção que ligam TNFR1. Em uma forma de realização, um antagonista multivalente de TNFR1 não agoniza substancialmente o TNFR1 (atua como um agonista de TNFR1) em um ensaio de célula padrão (isto é, quando presente em uma concentração de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M ou 5.000 μ M, resulta em não mais do que 5 % da atividade mediada pelo TNFR1 induzida pelo TNF α (100 pg/ml) no ensaio).

10 Em certas formas de realização, o antagonista multivalente de TNFR1 contém dois ou mais sítios de ligação para um epítipo desejado ou domínio de TNFR1. Por exemplo, o antagonista multivalente de TNFR1 pode compreender dois ou mais sítios de ligação que liguem o mesmo epítipo no Domínio 1 de TNFR1.

15 Em outras formas de realização, o antagonista multivalente de TNFR1 contém dois ou mais sítios de ligação fornecidos pelos polipeptídeos ou dAbs da invenção que ligam diferentes epítopos ou domínios de TNFR1. Em uma forma de realização, tais antagonistas multivalentes não agonizam TNFR1 quando presentes em uma concentração de cerca de 1 nM, ou cerca de 20 10 nM, ou cerca de 100 nM, ou cerca de 1 μ M, ou cerca de 10 μ M, em um ensaio padrão de citotoxicidade L929 ou um ensaio padrão HeLa IL-8 como descrito na WO 2006/038027.

25 Outros antagonistas de TNFR1 não inibem a ligação do TNF α ao TNFR1. Tais ligandos (e antagonistas) podem ter utilidade como agentes de diagnósticos, porque eles podem ser usados para ligar e detectar, quantificar ou medir, o TNFR1 em uma amostra, e não competirão com TNF na amostra para ligação ao TNFR1. Consequentemente, uma determinação precisa pode ser feita de se, ou quanto, TNFR1 se acha na amostra.

Em outras formas de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o

antagonista especificamente se ligam ao TNFR1 com uma K_D aqui descrita e inibem letalmente em um modelo padrão de choque séptico induzido por LPS/D-galactosamina em camundongo em pelo menos cerca de 10 %, em comparação com um controle adequado). Em uma forma de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista inibem letalmente em pelo menos cerca de 25 % ou em pelo menos cerca de 50 %, em comparação com um controle adequado em um modelo padrão de choque séptico induzido por LPS/D-galactosamina em camundongo quando administrados em cerca de 5 mg/kg ou mais, por exemplo em cerca de 1 mg/kg.

10 Em outras formas de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista ligam TNFR1 e antagonizam a atividade do TNFR1 em um ensaio de células padrão com uma $ND_{50} \leq 100$ nM, e em uma concentração ≤ 10 μ M o dAb agoniza a atividade do TNFR1 em ≤ 5 % no ensaio.

15 Em formas de realização particulares, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista não agoniza substancialmente o TNFR1 (atua como um agonista de TNFR1) em um ensaio de células padrão [isto é, quando presentes em uma concentração de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M ou 5.000 μ M, resulta em não mais do que cerca de 5 % da atividade mediata pelo TNFR1 induzida por $TNF\alpha$ (100 pg/ml) no ensaio].

20 Em certas formas de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista da invenção são eficazes nos modelos de doenças inflamatórias crônicas quando uma quantidade eficaz é administrada. Geralmente uma quantidade eficaz é de cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg (por exemplo, cerca de 1 mg/kg, cerca de 2 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, 25 cerca de 5 mg/kg, cerca de 6 mg/kg, cerca de 7 mg/kg, cerca de 8 mg/kg, cerca de 9 mg/kg ou cerca de 10 mg/kg). Os modelos de doença inflamatória crônica (ver aqueles descritos na WO 2006/038027) são reconhecidos por aqueles versados na técnica como sendo prenunciadores da eficácia terapêutica nos seres humanos.

Em formas de realização particulares, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista são eficazes no modelo padrão de artrite induzida pelo colágeno de camundongo (ver a WO 2006/038027 quanto a detalhes do modelo). Por exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, dAb ou antagonista pode reduzir a contagem artrítica média da soma dos quatro ramos no modelo padrão de artrite induzida pelo colágeno, por exemplo em cerca de 1 a cerca de 16, de cerca de 3 a cerca de 16, de cerca de 6 a cerca de 16, de cerca de 9 a cerca de 16, de cerca de 12 a cerca de 16, em comparação com um controle adequado. Em outro exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, do dAb ou do antagonista pode retardar o começo dos sintomas da artrite no modelo padrão de artrite induzida pelo colágeno de camundongo, por exemplo em cerca de 1 dia, em cerca de 2 dias, em cerca de 3 dias, em cerca de 4 dias, em cerca de 5 dias, em cerca de 6 dias, em cerca de 7 dias, em cerca de 10 dias, em cerca de 14 dias, em cerca de 21 dias ou em cerca de 28 dias, em comparação com um controle. Em outro exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, dAb ou antagonista pode resultar em uma classificação artrítica média da soma dos quatro ramos no modelo padrão de artrite induzida pelo colágeno de camundongo de 0 a cerca de 3, de cerca de 3 a cerca de 5, de cerca de 5 a cerca de 7, de cerca de 7 a cerca de 15, de cerca de 9 a cerca de 15, de cerca de 10 a cerca de 15, de cerca de 12 a cerca de 15, ou de cerca de 14 a cerca de 15.

Em outras formas de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista são eficazes no modelo Δ ARE de artrite de camundongo (ver a WO 2006/038027 quanto a detalhes do modelo). Por exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, dAb ou antagonista pode reduzir a contagem artrítica média no modelo Δ ARE de artrite de camundongo, por exemplo em cerca de 0,1 a cerca de 2,5, cerca de 0,5 a cerca de 2,5, cerca de 1 a cerca de 2,5, cerca de 1,5 a cerca de 2,5, ou cerca de 2 a

cerca de 2,5, em comparação com um controle adequado. Em outro exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, do dAb ou do antagonista pode retardar o início dos sintomas da artrite no modelo Δ ARE de artrite de camundongo em, por exemplo, cerca de 1 dia, cerca de 2 dias, cerca de 3 dias, cerca de 4 dias, cerca de 5 dias, cerca de 6 dias, cerca de 7 dias, cerca de 10 dias, cerca de 14 dias, cerca de 21 dias ou cerca de 28 dias, em comparação com um controle adequado. Em outro exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, dAb ou antagonista pode resultar em uma contagem artrítica média no modelo Δ ARE de artrite de camundongo de 0 a cerca de 0,5, de cerca de 0,5 a cerca de 1, de cerca de 1 a cerca de 1,5, de cerca de 1,5 a cerca de 2, ou de cerca de 2 a cerca de 2,5.

Em outras formas de realização, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista são eficazes no modelo Δ ARE de camundongo da doença inflamatória intestinal (IBD) (ver a WO 2006/038027 quanto a detalhes do modelo). Por exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, do dAb ou do antagonista pode reduzir a contagem média da inflamação aguda e/ou crônica no modelo Δ ARE da IBD de camundongo, por exemplo em cerca de 0,1 a cerca de 2,5, de cerca de 0,5 a cerca de 2,5, de cerca de 1 a cerca de 2,5, de cerca de 1,5 a cerca de 2,5, ou de cerca de 2 a cerca de 2,5, em comparação com um controle adequado. Em outro exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, do dAb ou do antagonista pode retardar o começo dos sintomas da IBD no modelo Δ ARE de IBD de camundongo em, por exemplo, cerca de 1 dia, cerca de 2 dias, cerca de 3 dias, cerca de 4 dias, cerca de 5 dias, cerca de 6 dias, cerca de 7 dias, cerca de 10 dias, cerca de 14 dias, cerca de 21 dias ou cerca de 28 dias, em comparação com um controle adequado. Em outro exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, do dAb ou do antagonista pode resultar em uma contagem média de inflamação aguda e/ou crônica no modelo Δ ARE de IBD em camundongo de 0 a cerca de 0,5, de cerca de 0,5 a

cerca de 1, de cerca de 1 a cerca de 1,5, de cerca de 1,5 a cerca de 2, ou de cerca de 2 a cerca de 2,5.

Em outras modalidades o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista são eficazes no modelo de IBD induzido pelo dextrano sulfato de sódio (DSS) de camundongo (ver a WO 2006/038027 quanto a detalhes do modelo). Por exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, do dAb ou do antagonista pode reduzir a contagem média de severidade no modelo de IBD de DSS de camundongo, por exemplo, em cerca de 0,1 a cerca de 2,5, cerca de 0,5 a cerca de 2,5, cerca de 1 a cerca de 2,5, cerca de 1,5 a cerca de 2,5, ou cerca de 2 a cerca de 2,5, em comparação com um controle adequado. Em outro exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, dAb ou antagonista pode retardar o começo dos sintomas de IBD no modelo de DSS de IBD de camundongo em, por exemplo, 1 dia, cerca de 2 dias, cerca de 3 dias, cerca de 4 dias, cerca de 5 dias, cerca de 6 dias, cerca de 7 dias, cerca de 10 dias, cerca de 14 dias, cerca de 21 dias ou cerca de 28 dias, em comparação com um controle adequado. Em outro exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo, do dAb ou do antagonista pode resultar em uma contagem média da severidade no modelo de DSS de IBD de camundongo de 0 a cerca de 0,5, de cerca de 0,5 a cerca de 1, de cerca de 1 a cerca de 1,5, de cerca de 1,5 a cerca de 2, ou de cerca de 2 a cerca de 2,5.

Em formas de realização particulares, o polipeptídeo, o dAb ou o antagonista são eficazes no modelo de fumo de tabaco de camundongo da doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) (ver as WO 2006/038027 e WO 2007/049017 quanto a detalhes do modelo). Por exemplo, a administração de uma quantidade eficaz do ligando pode reduzir ou retardar o começo dos sintomas de COPD, em comparação com um controle adequado.

Sistemas de modelos de animais que podem ser usados para testar a eficácia dos antagonistas de TNFR1 (por exemplo ligandos,

anticorpos ou suas proteínas de ligação) na proteção contra a doença ou no seu tratamento acham-se disponíveis. Métodos para os testes do lupo erimatoso sistêmico (SLE) em camundongos suscetíveis são conhecidos na técnica [Knight *et al.* (1978) *J. Exp. Med.*, 147: 1653; Reinersten *et al.* (1978) *New Eng. J. Med.*, 299: 515). A Miastenia Grave (MG) é testada em camundongos fêmeas SJL/J mediante a indução da doença com proteína AchR solúvel de outra espécie [Lindstrom *et al.* (1988) *Adv. Immunol.*, 42: 233]. A artrite é induzida em uma cepa suscetível de camundongos por injeção do colágeno Tipo II [Stuart *et al.* (1984) *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233]. Um modelo pelo qual a artrite adjuvante é induzida em ratos suscetíveis mediante injeção da proteína de choque térmico micobacteriana foi descrita [Van Eden *et al.* (1988) *Nature*, 331: 171]. A tireoidite é induzida em camundongos pela administração da tiroglobulina como descrito [Maron *et al.* (1980) *J. Exp. Med.*, 152: 1115]. O diabetes melito insulino-dependente (IDDM) ocorre naturalmente ou pode ser induzido em certas cepas de camundongos tais como aqueles descritas por Kanasawa *et al.* (1984) *Diabetologia*, 27: 113. A EAE em camundongo e rato serve como um modelo para MS em seres humanos. Neste modelo, a doença desmielinizante é induzida pela administração da proteína básica de mielina [ver Paterson (1986) *Textbook of Immunopathology*, Mischer *et al.*, editores, Grune e Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin *et al.* (1973) *Science*, 179: 478; e Satoh *et al.* (1987) *J. Immunol.*, 138: 179).

Geralmente, os presentes ligandos (por exemplo, antagonistas) serão utilizados na forma purificada juntamente com carreadores farmacologicamente apropriados. Tipicamente, estes carreadores incluem soluções, emulsões ou suspensões aquosas ou alcoólicas/aquosas, qualquer uma incluindo meios salinos e/ou tamponados. Veículos parenterais incluem a solução de cloreto de sódio, a dextrose de Ringer, a dextrose e cloreto de sódio e de Ringer lactado. Adjuvantes fisiologicamente aceitáveis adequados,

se necessário para manter um complexo de polipeptídeos em suspensão, podem ser escolhidos de espessantes tais como a carboximetilcelulose, a polivinilpirrolidona, gelatina e alginatos.

5 Veículos intravenosos incluem reabastecedores fluidos e nutritivos e reabastecedores eletrolíticos, tais como aqueles com base na dextrose de Ringer. Preservativos e outros aditivos, tais como agentes antimicrobianos, antioxidantes, de quelação e gases inertes, podem também estar presentes [Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a Edição]. Uma variedade de formulações adequadas pode ser usada, incluindo
10 formulações de dispensação prolongada.

Os ligandos (por exemplo, antagonistas) da presente invenção podem ser usados como composições separadamente administradas ou em combinação com outros agentes. Estes podem incluir vários medicamentos imunoterápicos, tais como a ciclosporina, o metotrexato, a adriamicina ou a
15 cisplatina, e imunotoxinas. As composições farmacêuticas podem incluir “coquetéis” de vários agente citotóxicos ou outros em combinação com os ligandos da presente invenção, ou mesmo combinações de ligandos de acordo com a presente invenção tendo diferentes especificidades, tais como ligando selecionados com o uso de diferentes antígenos alvo ou epítomos, quer ou não
20 eles sejam reunidos antes da administração.

A via de administração das composições farmacêuticas de acordo com a invenção pode ser qualquer uma daquelas comumente conhecidas daqueles de experiência normal na técnica. Para terapia, incluindo, sem limitação, a imunoterapia, os seus ligandos selecionados da invenção
25 podem ser administrados a qualquer paciente de acordo com técnicas padrão.

A administração pode ser por qualquer forma de realização apropriada, incluindo as vias parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, através da via pulmonar, ou também, apropriadamente, por infusão direta com cateter. A dosagem e a frequência de

administração dependerão da idade, do sexo e da condição do paciente, da administração simultânea de outros medicamentos, das contra-indicações e outros parâmetros a serem levados em conta pelo clínico. A administração pode ser local (por exemplo, dispensação local aos pulmões por administração pulmonar, por exemplo administração intranasal) ou sistêmica, conforme indicado.

Os ligandos desta invenção podem ser liofilizados para armazenagem, e reconstituídos em um carreador adequado antes do uso. Esta técnica foi mostrada ser eficaz com imunoglobulinas convencionais, e técnicas de liofilização e de reconstituição conhecidas na técnica podem ser empregadas. Será observado por aqueles habilitados na técnica, que a liofilização e a reconstituição pode levar a graus variados de perda de atividade de anticorpos (por exemplo, com imunoglobulinas convencionais, os anticorpos IgM tendem ter maior perda de atividade do que os anticorpos IgG) e que os níveis de uso poderão ter de ser ajustados para cima para compensar.

As composições contendo os presentes ligandos (por exemplo, antagonistas) ou um coquetel destes, podem ser administradas para tratamentos profiláticos e/ou terapêuticos. Em certas aplicações terapêuticas uma quantidade adequada para realizar inibição, supressão, modulação, extermínio pelo menos parciais, ou algum outro parâmetro mensurável, de uma população de células selecionadas, é definida como uma “dose terapeuticamente eficaz”. Quantidades necessárias para se obter estas dosagens dependerão da gravidade da doença e do estado geral do próprio sistema imune do paciente, mas geralmente varia de 0,005 a 5,0 mg de ligando, por exemplo dAb ou antagonista, por quilograma de peso corporal, com as doses de 0,05 a 2,0 mg/kg/dose sendo as mais comumente usadas. Para aplicações profiláticas, as composições contendo os presentes ligandos ou seus coquetéis podem também ser administradas em dosagens similares ou

levemente menores, para prevenir, inibir ou retardar o começo da doença (por exemplo, para remissão ou quiescência, ou para prevenir a fase aguda). O clínico habilitado será capaz de determinar o intervalo de dosagem apropriado para tratar, suprimir ou prevenir a doença. Quando um ligando de TNFR1 (por exemplo, antagonista) é administrado para tratar, suprimir ou prevenir uma doença inflamatória crônica, ele pode ser administrado até quatro vezes por dia, duas vezes por semana, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez por mês, ou uma vez a cada dois meses, em uma dose de, por exemplo, cerca de 10 µg/kg a cerca de 80 mg/kg, cerca de 100 µg/kg a cerca de 80 mg/kg, cerca de 1 mg/kg to cerca de 80 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 70 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 60 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 10 µg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 10 µg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 10 µg/kg a cerca de 2,5 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 2 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 5 mg/kg, cerca de 6 mg/kg, cerca de 7 mg/kg, cerca de 8 mg/kg, cerca de 9 mg/kg ou cerca de 10 mg/kg. Em modalidades particulares, o ligando de TNFR1 (por exemplo, antagonista) é administrado para tratar, suprimir ou prevenir uma doença inflamatória crônica uma vez a cada duas semanas ou uma vez por mês em uma dose de cerca de 10 µg/kg a cerca de 10 mg/kg (por exemplo, cerca de 10 µg/kg, cerca de 100 µg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 2 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 5 mg/kg, cerca de 6 mg/kg, cerca de 7 mg/kg, cerca de 8 mg/kg, cerca de 9 mg/kg ou cerca de 10 mg/kg).

O tratamento ou terapia realizada com o uso das composições aqui descritas é considerado “eficaz” se um ou mais dos sintomas forem reduzidos (por exemplo, em pelo menos 10 % ou pelo menos um ponto na escala de avaliação clínica), em relação a esses sintomas presentes antes do

tratamento, ou em relação a esses sintomas em um indivíduo (humano ou animal) não tratado com tal composição ou outro controle adequado. Os sintomas obviamente variarão, dependendo da doença ou do distúrbio alvejados, mas podem ser medidos por um clínico o técnico normalmente habilitado. Tais sintomas podem ser medidos, por exemplo, por monitoração do nível de um ou mais indicadores bioquímicos da doença ou distúrbio (por exemplo, níveis de uma enzima ou metabólito correlacionados com a doença, quantidades de células afetadas, etc.), pela monitoração das manifestações físicas (por exemplo, inflamação, tamanho do tumor, etc.), ou por uma escala de avaliação clínica aceita, por exemplo a Escala do Estado de Incapacidade Expandida (para esclerose múltipla), o Questionário da Doença Inflamatória Intestinal de Irvine (a avaliação de 32 pontos avalia a qualidade de vida em relação à função intestinal, sintomas sistêmicos, função social e estado emocional – faixas de classificação de 32 a 224, com as maiores classificações indicando uma melhor qualidade de vida), a Escala da Qualidade de Vida da Artrite Reumatóide, ou outra escala de avaliação clínica aceita conhecida na área. Uma redução prolongada (por exemplo um dia ou mais, ou por mais tempo) nos sintomas da doença ou do distúrbio de pelo menos 10 % ou de um ou mais pontos em uma dada escala clínica, é indicativo de tratamento “eficaz”. De forma semelhante, a profilaxia realizada com o uso de uma composição, como aqui descrito, é “eficaz” se o começo ou a gravidade de um ou mais sintomas forem retardados, reduzidos ou suprimidos em relação a tais sintomas de um indivíduo semelhante (ser humano ou modelo de animal) não tratado com a composição.

Uma composição contendo um ligando (por exemplo, antagonista) ou coquetel deste de acordo com a presente invenção, pode ser utilizada em cenários profiláticos e terapêuticos para auxiliar na alteração, inativação, extermínio ou remoção de uma população de células alvo selecionadas em um mamífero. Além disso, os repertórios selecionados dos

polipeptídeos aqui descritos podem ser usados extracorporeamente ou *in vitro* seletivamente exterminar, exaurir ou de outra forma eficazmente remover uma população de células alvo de um conjunto heterogêneo de células. O sangue de um mamífero pode ser combinado extracorporeamente com os ligandos por meio dos quais as células indesejáveis são mortas ou de outra forma removidas do sangue para retorno ao mamífero de acordo com técnicas padrão.

Uma composição contendo um ligando (por exemplo, antagonista) de acordo com a presente invenção pode ser utilizada nos cenários profiláticos e terapêuticos para auxiliar na alteração, inativação, extermínio ou remoção de uma população de células alvo selecionadas em um mamífero.

Os ligandos (por exemplo, antagonistas anti-TNFR1, monômeros de dAb) podem ser administrados e/ou formulados juntamente com um ou mais agentes adicionais terapêuticos ou ativos. Quando um ligando (por exemplo, um dAb) é administrado com um agente terapêutico adicional, o ligando pode ser administrado antes, simultaneamente ou subsequente à administração do agente adicional. Geralmente, o ligando e o agente adicional são administrados de uma maneira que proporcione uma sobreposição do efeito terapêutico.

Em uma forma de realização, a invenção é um método de tratar, suprimir ou prevenir uma doença inflamatória crônica, compreendendo administrar a um mamífero em necessidade do tratamento, uma dose ou quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo, dAb ou antagonista de TNFR1 de acordo com a invenção.

Em uma forma de realização, a invenção é um método de tratar, suprimir ou prevenir a artrite (por exemplo, a artrite reumatóide, a artrite reumatóide juvenil, a espondilite ancilósante, artrite psoriásica), compreendendo administrar a um mamífero em necessidade do tratamento,

uma dose ou quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo, dAb ou antagonista de TNFR1 de acordo com a invenção.

5 Em outra forma de realização, a invenção é um método para tratar, suprimir ou prevenir a psoríase, compreendendo administrar a um mamífero em necessidade deste tratamento, uma dose ou quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo, dAb ou antagonista de TNFR1 de acordo com a invenção.

10 Em outra forma de realização, a invenção é um método para tratar, suprimir ou prevenir a doença inflamatória intestinal (por exemplo, a doença de Crohn, a colite ulcerativa) compreendendo administrar a um mamífero em necessidade deste tratamento, uma dose ou quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo, dAb ou antagonista de TNFR1 de acordo com a invenção.

15 Em outra forma de realização, a invenção é um método para tratar, suprimir ou prevenir a doença pulmonar obstrutiva crônica (por exemplo, a bronquite crônica, bronquite obstrutiva crônica, enfisema), compreendendo administrar a um mamífero em necessidade de um tal tratamento, uma dose ou quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo, dAb ou antagonista de TNFR1 de acordo com a invenção.

20 Em outra forma de realização, a invenção é um método para tratar, suprimir ou prevenir a pneumonia (por exemplo, a pneumonia bacteriana, tal como a pneumonia estafilocócica), compreendendo administrar a um mamífero em necessidade de tal tratamento, uma dose ou quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo, dAb ou antagonista de TNFR1 de acordo com a invenção.

25 A invenção provê um método para tratar, suprimir ou prevenir outras doenças pulmonares além da doença pulmonar obstrutiva crônica e da pneumonia. Outras doenças pulmonares que podem ser tratadas, suprimidas ou prevenidas de acordo com a invenção incluem, por exemplo, a fibrose

cística e a asma (por exemplo, a asma esteróide-resistente). Assim, em outra forma de realização, a invenção é um método para tratar, suprimir ou prevenir uma doença pulmonar (por exemplo, fibrose cística, asma), compreendendo administrar a um mamífero em necessidade do tratamento, uma dose ou
5 quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo, dAb ou antagonista de TNFR1 de acordo com a invenção.

Em formas de realização particulares, um antagonista de TNFR1 é administrado através da dispensação pulmonar, tal como por inalação (por exemplo, inalação intrabronquial, intranasal ou oral, gotas
10 intranasais) ou por dispensação sistêmica (por exemplo parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea).

Em outra forma de realização, a invenção é um método de tratar, suprimir ou prevenir o choque séptico, compreendendo administrar a um mamífero em necessidade deste tratamento, uma dose ou quantidade
15 terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo, dAb ou antagonista de TNFR1 de acordo com a invenção.

Em um outro aspecto da invenção, é fornecida uma composição contendo um polipeptídeo, dAb ou antagonista de TNFR1 de acordo com a invenção, e um carreador, diluente ou excipiente
20 farmacologicamente aceitáveis.

Além disso, a presente invenção provê um método para o tratamento de doença com o uso de um polipeptídeo, dAb ou antagonista de TNFR1, ou uma composição de acordo com a presente invenção. Em uma forma de realização, a doença é câncer ou uma doença inflamatória, por
25 exemplo a artrite reumatóide, asma ou doença de Crohn.

FORMATOS

A meia-vida aumentada é útil em aplicações *in vivo* de imunoglobulinas, especialmente anticorpos e muito especialmente fragmentos de anticorpos de tamanho pequeno. Tais fragmentos (Fvs, Fvs ligado a

dissulfeto, Fabs, scFvs, dAbs) sofrem de rápida depuração do corpo; assim, enquanto eles são capazes de alcançar as muitas partes do corpo rapidamente, e são rápidos de se produzir e mais fáceis de manipular, suas aplicações *in vivo* têm sido limitadas por sua muito breve permanência *in vivo*. Uma forma de realização da invenção soluciona este problema proporcionando meia-vida aumentada dos ligandos *in vivo* e, conseqüentemente, tempos de permanência no corpo, da atividade funcional do ligando, mais longos.

Os métodos para análise farmacocinática e determinação da meia-vida do ligando serão familiares àqueles habilitados na técnica. Os detalhes podem ser encontrados em Kenneth, A. *et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*, e em Peters *et al., Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996). Referência é também feita a “*Pharmacokinetics*”, M. Gibaldi e D. Perron, publicado por Marcel Dekker, 2^a Rev. da edição (1982), que descreve os parâmetros farmacocinéticos tais como as meia-vidas t_{α} e t_{β} e a área sob a curva (AUC).

As meia-vidas ($t_{\alpha}^{1/2}$ e $t_{\beta}^{1/2}$) e a AUC podem ser determinadas de uma curva de concentração sérica do ligando em relação ao tempo. O pacote de análise WinNonlin (disponível da Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA) pode ser usado, por exemplo, para modelar a curva. Em uma primeira fase (a fase alfa) o ligando suporta principalmente a distribuição no paciente, com alguma eliminação. Uma segunda fase (fase beta) é a fase terminal quando o ligando tenha sido distribuído e a concentração sérica esteja sendo reduzida quando o ligando é depurado do paciente. A meia-vida t_{α} é a meia-vida da primeira fase e a meia-vida t_{β} é a meia-vida da segunda fase. Assim, em uma forma de realização, a presente invenção provê um ligando ou uma composição compreendendo um ligando de acordo com a invenção tendo uma meia-vida t_{α} na faixa de 15 minutos ou mais. Em uma forma de realização, a extremidade inferior da

faixa é de 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas ou 12 horas. Além disso, ou alternativamente, um ligando ou composição de acordo com a invenção terão uma meia-vida t_{α} na faixa de até 12 horas, inclusive. Em uma forma de realização, a extremidade inferior da faixa é de 11, 10, 9, 8, 7, 6 ou 5 horas. Um exemplo de uma faixa adequada é de 1 a 6 horas, 2 a 5 horas ou 3 a 4 horas.

Em uma forma de realização, a presente invenção provê um ligando (polipeptídeo, dAb ou antagonista) ou uma composição compreendendo um ligando de acordo com a invenção, tendo uma meia-vida t_{β} na faixa de 2,5 horas ou mais. Em uma forma de realização, a extremidade inferior da faixa é de 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas ou 12 horas. Além disso, ou alternativamente, um ligando ou composição de acordo com a invenção tem meia-vida t_{β} na faixa até 21 dias, inclusive. Em uma forma de realização, a extremidade superior da faixa é de 12 horas, 24 horas, 2 dias, 3 dias, 5 dias, 10 dias, 15 dias ou 20 dias. Em uma forma de realização, um ligando ou composição de acordo com a invenção terão uma meia-vida t_{β} na faixa de 12 a 60 horas. Em uma outra forma de realização, eles se situarão na faixa de 12 a 48 horas. Em uma outra forma de realização ainda, será na faixa de 12 a 26 horas.

Além disso, ou alternativamente aos critérios acima, a presente invenção provê um ligando ou uma composição compreendendo um ligando de acordo com a invenção, tendo um valor de AUC (área sob a curva) na faixa de 1 mg.min/ml ou mais. Em uma forma de realização, a extremidade inferior da faixa é de 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 ou 300 mg.min/ml. Além disso, ou alternativamente, um ligando ou composição de acordo com a invenção tem uma AUC na faixa de até 600 mg.min/ml. Em uma forma de realização, a extremidade superior da faixa é de 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 ou 50 mg.min/ml. Em uma forma de realização, um ligando de acordo com a

invenção terá uma AUC na faixa selecionada do grupo consistindo no seguinte: 15 a 150 mg.min/ml, 15 a 100 mg.min/ml, 15 a 75 mg.min/ml, e 15 a 50 mg.min/ml.

Os polipeptídeos e dAbs da invenção, e os antagonistas compreendendo-os, podem ser formatados para terem um tamanho hidrodinâmico maior, por exemplo pela ligação de um grupo de PEG, uma albumina sérica, transferrina, receptor de transferrina ou pelo menos a sua porção de ligação da transferrina, uma região de anticorpo, ou pela combinação a um domínio de anticorpo. Por exemplo, os polipeptídeos, os dAbs e os antagonista formatados como um fragmento de ligação a antígeno maior de um anticorpo ou como um anticorpo [por exemplo, formatado como Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, ScFv].

O tamanho hidrodinâmico dos ligandos (por exemplo, monômeros e multímeros de dAb) da invenção pode ser determinado com o uso de métodos que são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a cromatografia de filtração em gel pode se usada para determinar o tamanho hidrodinâmico de um ligando. Matrizes de filtração em gel adequadas para determinar os tamanhos hidrodinâmicos dos ligandos, tais como as matrizes de agarose reticuladas, são bem conhecidas e facilmente disponíveis.

O tamanho de um formato de ligando (por exemplo, o tamanho de um componente de PEG ligado a um monômero de dAb), pode ser variado, dependendo da aplicação desejada. Por exemplo, quando o ligando se destine a deixar a circulação e entrar nos tecidos periféricos, é desejável manter o tamanho hidrodinâmico do ligando baixo, para facilitar o extravasamento da corrente sanguínea. Alternativamente, quando se deseje ter a permanência do ligando na circulação sistêmica por um período de tempo mais longo, o tamanho do ligando pode ser aumentado, por exemplo pela formatação como uma proteína semelhante a Ig.

Extensão da meia-vida mediante alvejamento de um antígeno

ou epítopo que aumente a meia-vida *in vivo*

O tamanho hidrodinâmico de um ligando e sua meia-vida sérica podem também ser aumentados pela combinação ou associação de um polipeptídeo, dAb ou antagonista de ligação a TNFR1 da invenção, a um domínio de ligação (por exemplo, anticorpo ou fragmento de anticorpo) que ligue um antígeno ou epítopo que aumente a meia-vida *in vivo*, como aqui descrito. Por exemplo, o agente de ligação a TNFR1 (por exemplo, polipeptídeo) pode ser combinado ou ligado a uma albumina anti-soro ou anticorpo ou fragmento de anticorpo do receptor Fc anti-neonatal, por exemplo um receptor Fc anti-SA ou anti-neonatal dAb, Fab, Fab' ou scFv, ou a um aficorpo anti-SA ou aficorpo do receptor Fc anti-neonatal ou um avímero anti-SA, ou um domínio de ligação anti-SA que compreenda um andaime selecionado, porém preferivelmente não limitado, do grupo consistindo em CTLA-4, lipocalina, SpA, um aficorpo, um avímero, GroEl e fibronectina (ver PCT/GB 2008/000453 depositada em 8 de fevereiro de 2008, para apresentação deste domínio de ligação, cujos domínios e suas seqüências são aqui incorporadas como referência e fazem parte da descrição do presente texto). Combinação refere-se a uma composição contendo polipeptídeo, dAb ou antagonista da invenção é são ligados (covalente ou não covalentemente) a um domínio de ligação que ligue a albumina sérica.

Polipeptídeos adequados que intensificam a meia-vida sérica *in vivo* incluem, por exemplo, as proteínas de fusão do agente neurofarmacêutico específico do receptor da transferrina (ver a Patente U.S. nº 5.977.307, cujos preceitos são aqui incorporados como referência), o receptor das células endoteliais capilares do cérebro, a transferrina, o receptor da transferrina (por exemplo, o receptor da transferrina solúvel), insulina, o receptor do fator 1 de crescimento insulinóide (IGF 1), o receptor do fator 2 de crescimento insulinóide (IGF 2), receptor insulínico, o fator X de coagulação sanguínea, a antitripsina $\alpha 1$ e HNF 1α . Polipeptídeos adequados

que intensificam a meia-vida sérica também incluem a glicoproteína alfa-1 (orosomucóide; AAG), a antiqumotripsina alfa-1 (ACT), microglobulina alfa-1 (proteína HC; AIM), antitrombina III (AT III), apolipoproteína A-1 (Apo A-1), apolipoproteína B (Apo B), ceruloplasmina (Cp), componente C3 complementar (C3), componente complementar C4 (C4), inibidor da esterase C1 (INH C1), proteína C-reativa (CRP), ferritina (FER), hemopexina (HPX), lipoproteína (a) [Lp(a)], proteína de ligação a manose (MBP), mioglobina (Myo), pré-albumina (transtiretina; PAL), proteína ligadora de retinol (RBP), e fator reumatóide (RF).

10 Proteínas adequadas da matriz extracelular incluem, por exemplo, colágenos, lamininas, intreginas e fibronectinas. Colágenos são as proteínas principais da matriz extracelular. Cerca de 15 tipos de moléculas de colágeno são presentemente conhecidos, encontrados em diferentes partes do corpo, por exemplo o colágeno do tipo I (responsável por 90 % do colágeno do corpo) encontrado nos ossos, na pele, nos tendões, nos ligamentos, na 15 córnea, nos órgãos internos, ou o colágeno do tipo II encontrado na cartilagem, nos discos vertebrais, no notocórdio e no humor vítreo dos olhos.

20 Proteínas adequadas do sangue incluem, por exemplo, as proteínas plasmáticas (por exemplo, fibrina, macroglobulina α -2, albumina sérica, fibrinogênio (por exemplo o fibrinogênio A, o fibrinogênio B), a proteína amilóide A do soro, a haptoglobina, profilina, ubiquitina, uteroglobulina e microglobulina β -2), enzimas e inibidores de enzimas (por exemplo, plasminogênio, lisozima, cistatina C, antitripsina alfa-1 e inibidor da tripsina pancreática), proteínas do sistema imune, tais como as proteínas de 25 imunoglobulina [por exemplo IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, cadeias leves de imunoglobulinas (capa/lambda)], proteínas de transporte (por exemplo, a proteína ligadora de retinol, microglobulina α -1), defensinas (por exemplo a beta-defensina 1, a defensina 1 neutrófila, a defensina 2 neutrófila e a defensina 3 neutrófila), e outras.

Polipeptídeos adequados que intensificam a meia-vida sérica *in vivo* também incluem proteínas localizadas nos rins (por exemplo a policistina, colágeno tipo IV, transportador K1 de ânions orgânicos, antígeno de Heymann), proteínas localizadas no fígado (por exemplo, álcool desidrogenase, G250), proteínas localizadas nos pulmões (por exemplo, o componente secretório, que liga IgA), proteínas localizadas no coração (por exemplo, HSP 27, a qual é associada com a cardiomiopatia dilatada), proteínas localizadas na pele (por exemplo, a ceratina), proteínas específicas dos ossos, tais como as proteínas morfogênicas (BMPs), que são um subconjunto da superfamília β do fator de crescimento transformador das proteínas que demonstram atividade osteogênica (por exemplo, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8), proteínas específicas de tumores [por exemplo, o antígeno do trofoblasto, o receptor da herceptina, o receptor estrogênico, catepsinas (por exemplo, a catepsina B, que pode ser encontrada no fígado e no baço)].

Proteínas específicas da doença adequadas incluem, por exemplo, antígenos expressos apenas sobre células T ativadas, incluindo LAG-3 (gene de ativação linfocítica), ligando de osteoprotegerina [OPGL; ver *Nature* 402, 304-309 (1999)], OX40 [um membro da família do receptor de TNF, expresso sobre células T ativadas e especificamente regulado positivamente nas células produtoras de (HTLV-I) tipo I do vírus da leucemia de células T humanas; ver *Immunol.* 165 (1): 263-270 (2000)]. Proteínas adequadas específicas de doenças também incluem, por exemplo, as metaloproteases (associadas com artrite/cânceres) incluindo a *Drosophila* CG6512, a paraplegina humana, FtsH humano, AFG3L2 humano, FtsH murino; e fatores de crescimento angiogênicos, incluindo o fator de crescimento de fibroblasto ácido (FGF-1), o fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-2), o fator de crescimento endotelial vascular/fator de permeabilidade vascular (VEGF/VPF), o fator- α de crescimento

transformador (TGF- α), o fator-alfa de necrose tumoral (TNF- α), angiogenina, interleucina-3 (IL-3), interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), fator de crescimento placentário (PIGF), fator BB de crescimento derivado de plaquetas midcinas, (PDGF), e fractalcina.

Polipeptídeos adequados que intensificam a meia-vida sérica *in vivo* também incluem as proteínas de estresse, tais como as proteínas de choque térmico (HSPs). As HSPs são normalmente encontradas intracelularmente. Quando elas são encontradas extracelularmente, isto é um indicador de que uma célula morreu e derramou seus conteúdos. Esta morte celular não programada (necrose) ocorre quando, como um resultado do trauma, a doença ou lesão, HSPs extracelulares, disparam uma resposta do sistema imune.

A ligação à HSP extracelular pode resultar na localização das composições da invenção em um sítio da doença.

Proteínas adequadas envolvidas no transporte de Fc incluem, por exemplo, o receptor de Brambell (também conhecido como FcRB). Este receptor de Fc tem duas funções, ambas as quais são potencialmente úteis para dispensação. As funções são (1) transporte da IgG da mãe para a criança através da placenta, (2) proteção da IgG contra a degradação, por esse meio prolongando sua meia-vida sérica. Pensa-se que o receptor recicla IgG dos endossomas. [Ver Holliger *et al.*, *Nat Biotechnol* 15(7): 632-636 (1997)].

dAbs que Ligam a Albumina Sérica

A invenção, em uma forma de realização, provê um polipeptídeo ou antagonista [por exemplo, ligando específico duplo compreendendo um dAb anti-TNFR1 (um primeiro dAb)] que se liga a TNFR1, e um segundo dAb que se liga à albumina sérica (SA), o segundo dAb ligando-se à SA com uma K_D determinada por ressonância de plásmon superficial de 1 nM a 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 300,

400 ou 500 μM (isto é, $\times 10^{-9}$ a 5×10^{-4}), ou 100 nM a 10 μM , ou 1 a 5 μM ou 3 a 70 nM ou 10 nM a 1, 2, 3, 4 ou 5 μM . Por exemplo, 30 a 70 nM, determinado por ressonância de plásmon superficial. Em uma forma de realização, o primeiro dAb (ou um monômero de dAb) liga SA (por exemplo, HSA) com uma K_D determinada por ressonância de plásmon superficial de aproximadamente 1, 50, 70, 100, 150, 200, 300 nM ou 1, 2 ou 3 μM . Em uma forma de realização, para um ligando específico duplo compreendendo um primeiro dAb anti-SA e um segundo dAb ao TNFR1, a afinidade (por exemplo K_D e/ou $K_{\text{desligado}}$ medidos por ressonância de plásmon superficial, por exemplo com o uso de BiaCore) do segundo dAb pelo seu alvo, é de 1 a 100000 vezes (por exemplo, de 100 a 100000, ou 1000 a 100000, ou 10000 a 100000 vezes) a afinidade do primeiro dAb pela SA. Em uma forma de realização, a albumina sérica é albumina sérica humana (HSA). Por exemplo, o primeiro dAb liga SA com uma afinidade de aproximadamente 10 μM , enquanto o segundo dAb liga seu alvo com uma afinidade de 100 pM. Em uma forma de realização, a albumina sérica é albumina sérica humana (HSA). Em uma forma de realização, o primeiro dAb liga SA (por exemplo, HSA) com uma K_D de aproximadamente 50, por exemplo 70, 100, 150 ou 200 nM. Os detalhes dos ligandos específicos duplos são encontrados nas WO 03002609, WO 04003019 e WO 04058821.

Os ligandos da invenção podem, em uma forma de realização, compreender um dAb que ligue a albumina sérica (SA) com uma K_D determinada pela ressonância de plásmon superficial de 1 nM a 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 300, 400 ou 500 μM (isto é, $\times 10^{-9}$ a 5×10^{-4}), ou 100 nM a 10 μM , ou 1 a 5 μM ou 3 a 70 nM ou 10 nM a 1, 2, 3, 4 ou 5 μM . Por exemplo 30 a 70 nM, como determinado por ressonância de plásmon superficial. Em uma forma de realização, o primeiro dAb (ou um monômero de dAb) liga SA (por exemplo, HSA) com uma K_D determinada pós ressonância de plásmon superficial de aproximadamente 1, 50, 70, 100,

150, 200, 300 nM ou 1, 2 ou 3 μ M. Em uma forma de realização, o primeiro e o segundo dAbs são ligados por um ligador, por exemplo um ligador de 1 a 4 aminoácidos ou de 1 a 3 aminoácidos, ou mais do que 3 aminoácidos ou mais do que 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ou 20 aminoácidos. Em uma forma de realização, um ligador mais longo (mais do que 3 aminoácidos) é usado para intensificar a potência (K_D de um ou de ambos dAbs no antagonista).

Em formas de realização particulares dos ligandos e antagonistas, o dAb liga albumina sérica humana e compete quanto à ligação à albumina com um dAb selecionado do grupo consistindo em:

10 MSA-16, MSA-26 (Ver a WO 04003019 quanto a apresentação destas sequências, as quais, e suas contrapartes de ácido nucleico, ficam aqui incorporadas como referência e fazem parte da descrição do presente texto),

DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473), DOM7m-12 (SEQ ID NO: 474), DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475), DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476), DOM7r-3 (SEQ ID NO: 477), DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478), DOM7r-5 (SEQ ID NO: 479), DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480), DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481), DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496), DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7r-15 (SEQ ID NO: 499), DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500), DOM7r-17 (SEQ ID NO: 501), DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502), DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503), DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504), DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505), DOM7r-22 (SEQ ID NO: 506), DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507), DOM7r-24 (SEQ ID NO: 508), DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509), DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510),

DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511), DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512), DOM7r-29 (SEQ ID NO: 513), DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514), DOM7r-31 (SEQ ID NO: 515), DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516), DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517) (Ver a WO 2007/080392 quanto à apresentação destas sequências, as quais, e sua

5 contraparte de ácido nucleico, são aqui incorporadas como referência e fazem parte da descrição do presente texto; as SEQ ID NOs neste parágrafo são aquelas que aparecem na WO 2007/080392), dAb8 (dAb10), dAb10, dAb36, dAb7r20 (DOM7r20), dAb7r21 (DOM7r21), dAb7r22 (DOM7r22), dAb7r23 (DOM7r23), dAb7r24 (DOM7r24), dAb7r25 (DOM7r25), dAb7r26 (DOM7r26), dAb7r27 (DOM7r27), dAb7r28 (DOM7r28), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r31 (DOM7r31), dAb7r32 (DOM7r32), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7h22 (DOM7h22), dAb7h23 (DOM7h23), dAb7h24 (DOM7h24), dAb7h25 (DOM7h25), dAb7h26 (DOM7h26), dAb7h27 (DOM7h27), dAb7h30 (DOM7h30), dAb7h31 (DOM7h31), dAb2 (dAbs 4, 7, 41), dAb4, dAb7, dAb11, dAb12 (dAb7m12), dAb13 (dAb 15), dAb15, dAb16 (dAb21, dAb7m16), dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25 (dAb26, dAb7m26), dAb27, dAb30 (dAb35), dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38 (dAb54), dA41, dAb46 (dAbs 47, 52 e 56), dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1 (DOM 7r1), dAb7r3 (DOM7r3), dAb7r4 (DOM7r4), dAb7r5 (DOM7r5), dAb7r7 (DOM7r7), dAb7r8 (DOM7r8), dAb7r13 (DOM7r13), dAb7r14 (DOM7r14), dAb7r15 (DOM7r15), dAb7r16 (DOM7r16), dAb7r17 (DOM7r17), dAb7r18 (DOM7r18), dAb7r19 (DOM7r19), dAb7h1 (DOM7h1), dAb7h2 (DOM7h2), dAb7h6 (DOM7h6), dAb7h7 (DOM7h7), dAb7h8 (DOM7h8), dAb7h9 (DOM7h9), dAb7h10 (DOM7h10), dAb7h11 (DOM7h11), dAb7h12 (DOM7h12), dAb7h13 (DOM7h13), dAb7h14 (DOM7h14), dAb7p1 (DOM7p1) e dAb7p2 (DOM7p2) (ver a PCT/GB 2008/000453 depositada em

10

15

20

25

8 de fevereiro de 2008, quanto à apresentação destas sequências, as quais e

sua contraparte de ácido nucleico, são aqui incorporadas como referência e fazem parte da descrição do presente texto). Nomes alternativos são apresentados em parênteses após o dAbm por exemplo o dAb8 tem um nome alternativo que é dAb10, isto é dAb8 (dAb10). Estas sequências são também
5 apresentadas nas Figuras 51a e b.

Em certas formas de realização, o dAb liga a albumina de soro humano e compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 80 %, ou pelo menos cerca de 85 %, ou pelo menos cerca de 90 %, ou pelo menos cerca de 95 %, ou pelo menos cerca de 96 %, ou pelo menos
10 cerca de 97 %, ou pelo menos cerca de 98 %, ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de um dAb selecionado do grupo consistindo em:

MSA-16, MSA-26,

DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473), DOM7m-12 (SEQ ID NO:
15 474), DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475), DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476),
DOM7r-3 (SEQ ID NO: 477), DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478), DOM7r-5 (SEQ
ID NO: 479), DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480), DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481),
DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4
(SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:
20 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489),
DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25
(SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID
NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496),
DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7r-15
25 (SEQ ID NO: 499), DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500), DOM7r-17 (SEQ ID NO:
501), DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502), DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503),
DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504), DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505), DOM7r-22
(SEQ ID NO: 506), DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507), DOM7r-24 (SEQ ID NO:
508), DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509), DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510),

DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511), DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512), DOM7r-29 (SEQ ID NO: 513), DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514), DOM7r-31 (SEQ ID NO: 515), DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516), DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517) (as SEQ ID NO's neste parágrafo são aquelas que aparecem na WO 2007/080392),

5 dAb8, dAb10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb11 dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, 10 dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1, dAb7r3, dAb7r4, dAb7r5, dAb7r7, dAb7r8, dAb7r13, dAb7r14, dAb7r15, dAb7r16, dAb7r17, dAb7r18, dAb7r19, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, 15 dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13, dAb7h14, dAb7p1 e dAb7p2.

Por exemplo, o dAb que liga a albumina de soro humano pode compreender uma sequência de aminoácidos que tenha pelo menos cerca de 90 %, ou pelo menos cerca de 95 %, ou pelo menos cerca de 96 %, ou pelo menos cerca de 97 %, ou pelo menos cerca de 98 %, ou pelo menos cerca de 20 99 % de identidade de sequência de aminoácidos com DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496), DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), 25 DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495) (as SEQ ID NO's neste parágrafo são aquelas que aparecem na WO 2007/080392),

dAb8, dAb10, dAb36, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24,

Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 e dAb7h14.

Em certas formas de realização, o dAb liga a albumina de soro humano e compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 80 %, ou pelo menos cerca de 85 %, ou pelo menos cerca de 90 %, ou pelo menos cerca de 95 %, ou pelo menos cerca de 96 %, ou pelo menos cerca de 97 %, ou pelo menos cerca de 98 %, ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de um dAb selecionado do grupo consistindo em:

DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495) (as SEQ ID NO's neste parágrafo são aquelas que aparecem na WO 2007/080392),

dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb41, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 e dAb7h14.

Em formas de realização mais particulares, o dAb é um dAb V_{κ} que liga a albumina de soro humano e tem uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo de

DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-8

(SEQ ID NO: 496) (as SEQ ID NO's neste parágrafo são aquelas que aparecem na WO 2007/080392),

dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb41, dAb54, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 e dAb7h14.

Em formas de realização mais particulares, o dAb é um dAb V_H que liga a albumina de soro humano e tem uma sequência de aminoácidos selecionada de dAb7h30 e dAb7h31.

Em formas de realização mais particulares, o dAb é dAb7h11 ou dAb7h14.

Em outras formas de realização particulares, o dAb, o ligando ou o antagonista ligam a albumina de soro humano e compreendem uma, duas ou três das CDRs de quaisquer sequências de aminoácidos citadas acima, por exemplo uma, duas ou três das CDRs de dAb7h11 ou dAb7h14.

V_{HH} Camelídeos adequados que ligam a albumina de soro incluem aqueles apresentados na WO 2004/041862 (Ablynx N.V.) e na WO 2007/080392 (cujas sequências V_{HH} e suas contrapartes de ácido nucleico são aqui incorporadas como referência e fazem parte da descrição do presente texto), tais como a Sequência A (SEQ ID NO: 518), a Sequência B (SEQ ID NO: 519), a Sequência C (SEQ ID NO: 520), a Sequência D (SEQ ID NO: 521), a Sequência E (SEQ ID NO: 522), a Sequência F (SEQ ID NO: 523), a Sequência G (SEQ ID NO: 524), a Sequência H (SEQ ID NO: 525), a Sequência I (SEQ ID NO: 526), a Sequência J (SEQ ID NO: 527), a Sequência K (SEQ ID NO: 528), a Sequência L (SEQ ID NO: 529), a Sequência M (SEQ ID NO: 530), a Sequência N (SEQ ID NO: 531), a Sequência O (SEQ ID NO: 532), a Sequência P (SEQ ID NO: 533), a Sequência Q (SEQ ID NO: 534), estes números de sequências correspondendo àqueles citados nas WO 2007/080392 ou WO 2004/041862 (Ablynx N.V.). Em certas formas de realização, o V_{HH} *Camelid* liga a

albumina de soro humano e compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 80 %, ou pelo menos cerca de 85 %, ou pelo menos cerca de 90 %, ou pelo menos cerca de 95 %, ou pelo menos cerca de 96 %, ou pelo menos cerca de 97 %, ou pelo menos cerca de 98 %, ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência de aminoácidos com ALB1 apresentado na WO 2007/080392 ou em qualquer uma das SEQ ID NOS: 518 a 534, estes números de sequência correspondendo àqueles citados nas WO 2007/080392 ou WO 2004/041862.

Em algumas formas de realização, o ligando ou antagonista compreende um dAb de albumina anti-soro que compete com qualquer dAb de albumina anti-soro aqui apresentada para ligação à albumina sérica (por exemplo, albumina sérica humana).

Em uma forma de realização alternativa, o antagonista ou ligando compreendem um componente de ligação específico para TNFR1 (por exemplo, TNFR1 humano), em que o componente compreende sequências não de imunoglobulinas como descrito no pedido copendente PCT/GB 2008/000453, depositado em 8 de fevereiro de 2008, a apresentação destes componentes de ligação, seus métodos de produção e seleção (por exemplo, de diversas bibliotecas) e suas sequências, ficando aqui incorporados como referência como parte da descrição do presente texto.

Combinação com um componente que estende a meia-vida (por exemplo, a albumina)

Em uma forma de realização, um (um ou mais) componente que estende a meia-vida (por exemplo, albumina, transferrina e fragmentos e análogos destas) é combinada ou associada com o polipeptídeo, dAb ou antagonista de ligação de TNFR1 da invenção. Exemplos de albumina, fragmentos de albumina ou variantes de albumina para uso em um formato de ligação a TNFR1, são descritos na WO 2005/077042, cujo teor é aqui incorporado como referência e faz parte da descrição do presente texto. Em

particular, a seguinte albumina, fragmentos de albumina ou variantes de albumina podem ser usados na presente invenção:

- SEQ ID NO: 1 (como apresentada na WO 2005/077042, esta sequência sendo explicitamente incorporada no presente relatório descritivo como referência);
- Fragmento ou variante de albumina compreendendo ou consistindo nos aminoácidos 1 a 387 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042;
- Albumina, ou seu fragmento ou variante, compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: (a) aminoácidos 54 a 61 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; (b) aminoácidos 76 a 89 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; (c) aminoácidos 92 a 100 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; (d) aminoácidos 170 a 176 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; (e) aminoácidos 247 a 252 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; (f) aminoácidos 266 a 277 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; (g) aminoácidos 280 a 288 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; (h) aminoácidos 362 a 368 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; (i) aminoácidos 439 a 447 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; (j) aminoácidos 462 a 475 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; (k) aminoácidos 478 a 486 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042; e (l) aminoácidos 560 a 566 da SEQ ID NO: 1 na WO 2005/077042.

Outros exemplo de albumina, fragmentos e análogos adequados para uso em um formato de ligação a TNFR1 são descritos na WO 03/076567, cujo conteúdo fica aqui incorporado como referência, e que passa a fazer parte do teor do presente texto. Em particular, a albumina, os fragmentos ou as variantes a seguir podem ser usadas na presente invenção:

- Albumina sérica humana, como descrito na WO 03/076567, por exemplo na Figura 3 (esta informação de sequência sendo explicitamente incorporada no presente relatório descritivo, como referência);
- Albumina sérica humana (HA) consistindo em uma cadeia

única de polipeptídeos não glicosilados de 585 aminoácidos com um peso molecular de fórmula de 66.500 [Ver Meloun *et al.*, *FEBS Letters* 58: 136 (1975); Behrens *et al.*, *Fed. Proc.* 34: 591 (1975); Lawn *et al.*, *Nucleic Acids Research* 9: 6102-6114 (1981); Minghetti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261: 6747 (1986)];

5 • Uma variante polimórfica ou análogo ou fragmento de albumina, conforme descrito em Weitkamp *et al.*, *Ann. Hum. Genet.* 37: 219 (1973);

 • Um fragmento de albumina ou variante como descrito na EP 322094, por exemplo HA(1-373, HA(1-388), HA(1-389), HA(1-369) e
10 HA(1-419) e fragmentos entre 1-369 e 1-419;

 • Um fragmento de albumina ou variante como descrito na EP 399666, por exemplo HA(1-177) e HA(1-200) e fragmentos entre HA(1-X), em que X é qualquer número de 178 a 199.

 Quando um (um ou mais) componente de extensão da meia-
15 vida (por exemplo, albumina, transferrina e seus fragmentos e análogos) é usado para formatar os polipeptídeos. dAbs e antagonistas de ligação a TNFR1 da invenção, ele pode ser combinado com o uso de qualquer método adequado, tal como por fusão direta ao componente de ligação a TNFR1 (por exemplo, dAb anti-TNFR1), por exemplo mediante o uso de uma construção
20 de nucleotídeo único que codifique uma proteína de fusão, em que a proteína de fusão é codificada como uma cadeia de polipeptídeo único com o componente estendendo a meia-vida localizado no N-terminal ou no C-terminal no componente de ligação ao TNFR1. Alternativamente, a combinação pode ser obtida pelo uso de um ligador de peptídeo entre os componentes, por
25 exemplo um ligador de peptídeo como descrito na WO 03/076567 ou na WO 2004/003019 (as apresentações destes ligadores ficam incorporadas como referência no presente relatório descritivo para prover exemplos para uso na presente invenção). Tipicamente, um polipeptídeo que intensifique a meia-vida sérica *in vivo* é um polipeptídeo que ocorre naturalmente *in vivo* e que resiste à

degradação ou remoção por mecanismos endógenos que removem material indesejável do organismo (por exemplo, humano). Por exemplo, um polipeptídeo que intensifique a meia-vida sérica *in vivo* pode ser selecionado das proteínas da matriz extracelular, proteínas encontradas no sangue, proteínas encontradas na barreira hematoencefálica ou no tecido neural, proteínas localizadas nos rins, no fígado, pulmões, coração, pele ou ossos, proteínas de estresse, proteínas específicas de doenças, ou proteínas envolvidas no transporte de Fc.

Nas formas de realização da invenção descritas na totalidade deste relatório descritivo, ao invés do uso de um “dAb” anti-TNFR1 em um antagonista ou ligando da invenção, é considerado que o destinatário habilitado possa usar um polipeptídeo ou domínio que compreenda uma ou mais, ou todas as três, das CDRs de uma dAb da invenção que se ligue a TNFR1 (por exemplo, CDRs enxertada sobre um andaime ou esqueleto protéico adequado, por exemplo um aficorpo, um andaime de SpA, um domínio de classe A do receptor LDL ou um domínio de EGF). A invenção como um todo deve ser interpretada de acordo a prover a descrição dos antagonistas com o uso de tais domínios no lugar de um dAb. A este respeito, ver a PCT/GB 2008/000453 depositada em 8 de fevereiro de 2008, cujo conteúdo fica aqui incorporado como referência).

Em uma forma de realização, portanto, um antagonista da invenção compreende um domínio variável único de imunoglobulina ou anticorpo domínio (dAb) que tenha especificidade de ligação para TNFR1 ou as regiões determinantes da complementaridade de um tal dAb em um formato adequado. O antagonista pode ser um polipeptídeo que consista de um tal dAb, ou consista essencialmente de um tal dAb. O antagonista pode ser um polipeptídeo que compreenda um dAb (ou as CDRs de um dAb) em um formato adequado, tal como um formato de anticorpo [por exemplo, formato semelhante a IgG, ScFv, Fab, Fab', F(ab')₂], ou um ligando específico duplo que compreenda um dAb que ligue o TNFR1 e um segundo dAb que ligue

outra proteína, antígeno ou epítipo alvo (por exemplo, albumina sérica).

Os polipeptídeos, dAbs e antagonistas de acordo com a invenção podem ser formatados como uma variedade de formatos de anticorpos adequados que sejam conhecidos na técnica, tais como os formatos semelhantes a IgG, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, anticorpos de cadeia única, anticorpos biespecíficos, cadeias pesadas de anticorpos, cadeias leves de anticorpos, homodímeros e heterodímeros de cadeias pesadas e/ou cadeias leves de anticorpos, fragmentos de ligação a antígenos de qualquer dos anteriormente citados [por exemplo, um fragmento Fv (por exemplo, Fv de cadeia única (scFv), um Fv ligado a dissulfeto), um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento F(ab')₂], um domínio variável único (por exemplo, V_H, V_L), um dAb, e versões modificadas de quaisquer dos precedentes [por exemplo, modificadas pela ligação covalente do polialquileno glicol (por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, polibutileno glicol) ou outro polímero adequado).

Em algumas formas de realização, a invenção fornece um ligando (por exemplo, um antagonista anti-TNFR1) que é um formato como IgG. Tais formatos têm uma estrutura de quatro cadeias convencionais de uma molécula de IgG (2 cadeias pesadas e duas cadeias leves), nas quais uma ou mais das regiões variáveis (V_H e/ou V_L) tenham sido substituídas por um dAb da invenção. Em uma forma de realização, cada uma das regiões variáveis (2 regiões V_H e 2 regiões V_L) é substituída por um dAb ou um domínio variável único, pelo menos um dos quais seja um dAb anti-TNFR1 de acordo com a invenção. Os dAb(s) ou domínio(s) variável(eis) único(s) que são incluídos em um formato como IgG, podem ter a mesma especificidade ou diferentes especificidades. Em algumas formas de realização, o formato como IgG é tetravalente e pode ter uma (apenas anti-TNFR1), duas (por exemplo, anti-TNFR1 e anti-SA), três ou quatro especificidades. Por exemplo o formato como IgG pode ser monoespecífico e compreende 4 dAbs que têm a mesma especificidade; biespecíficos

e compreendem 3 dAbs que têm a mesma especificidade e outro dAb que tem uma especificidade diferentes; biespecífico e compreende dois dAbs que têm a mesma especificidade e dois dAbs que têm uma especificidade comum, porém diferente; triespecífico e compreende primeiro e segundo dAbs que têm a mesma especificidade, um terceiro dAb com uma diferente especificidade e um quarto dAb com uma especificidade diferentes dos primeiro, segundo e terceiro dAbs; ou tetraespecífico e compreende quatro dAbs cada um tendo diferente especificidade. Os fragmentos de ligação a antígeno dos formatos como IgG (por exemplo, Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv) podem ser preparados. Em uma forma de realização, os formatos como IgG ou seus fragmentos de ligação a antígeno não reticulam o TNFR1, por exemplo, o formato pode ser monovalente quanto a TNFR1. Se a ativação complementar e/ou a função de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) forem desejadas, o ligando pode ser um formato como IgG1. Se desejável, o formato como IgG pode compreender uma região constante transformada (região constante de cadeia pesada de IgG variante) para minimizar a ligação aos receptores Fc e/ou a capacidade de fixar o complemento. (ver, por exemplo, Winter *et al.*, GB 2.209.757 B; Morrison *et al.*, WO 89/07142; Morgan *et al.*, WO 94/29351, 22 de dezembro de 1994).

Os ligandos da invenção (polipeptídeos, dAbs e antagonistas) podem ser formatados como uma proteína de fusão que contenha um primeiro domínio variável único de imunoglobulina que seja fundido diretamente a um segundo domínio variável único de imunoglobulina. Se desejável, um tal formato pode ainda compreender um componente de prolongamento da meia-vida. Por exemplo, o ligando pode compreender um primeiro domínio variável único de imunoglobulina que seja fundido diretamente a um segundo domínio variável único de imunoglobulina que seja fundido diretamente a um domínio variável único de imunoglobulina que ligue a albumina sérica.

Geralmente a orientação dos domínios polipeptídicos que tenham um sítio de ligação com especificidade de ligação para um alvo, e se o

ligando compreender um ligador, é uma questão de escolha do planejamento. Entretanto, algumas orientações, com ou sem ligadores, podem prover melhores características de ligação do que outras orientações. Todas as orientações (por exemplo, dAb1-ligador-dAb2; dAb2-ligador-dAb1) abrangidas pela invenção são ligandos que contêm uma orientação que provê as características de ligação desejadas, podendo ser facilmente identificadas mediante triagem.

Os polipeptídeos e dAbs de acordo com a invenção, incluindo monômeros, dímeros e trímeros de dAb, podem ser ligados a uma região Fc de anticorpo, compreendendo um ou ambos os domínios C_H2 e C_H3, e opcionalmente uma região da dobradiça. Por exemplo, os vetores que codificam ligandos ligados como uma sequência única de nucleotídeos a uma região Fc, podem ser usados para preparar tais polipeptídeos.

A invenção, além disso, provê dímeros, trímeros e polímeros dos monômeros de dAb acima mencionados.

SEQUÊNCIAS OTIMIZADAS PELO CÓDON

Como descrito acima, as formas de realização da invenção fornecem sequências de nucleotídeos otimizadas pelo códon codificando polipeptídeos e domínios variáveis da invenção. Como mostrado na seguinte ilustração, podem ser produzidas sequências otimizadas pelo códon, de cerca de 70 % de identidade, que codificam para o mesmo domínio variável (neste caso a sequência de aminoácidos do domínio variável é idêntica ao DOM1h-131-206). Neste caso, as sequências foram otimizadas quanto à expressão por *Pichia pastoris* (sequências 1 a 3 otimizadas pelo códon) ou por *E. coli* (sequências 4 a 5 otimizadas pelo códon).

Nós realizamos um cálculo levando em conta a degeneração no código genético e maximizamos o número de mudanças de nucleotídeos dentro de cada códon degenerado codificado pela sequência de nucleotídeos de DOM1h-131-206 conforme mostrado na Figura 19, e uma sequência de

nucleotídeos teórica que ainda codifica um domínio variável que é idêntico ao DOM1h-131-206. O cálculo revelou que a sequência teórica deve ter apenas 57 % de identidade à sequência de nucleotídeos do DOM1h-131-206 como mostrado na Figura 19.

5

Sequência 1 Otimizada pelo Códon

Sequência de DNA

gaggttcaattggttggaaatccgggtgggtggattgggttcaacctgggtgggttctttgagattgtcctgtgctg
 cttccggttttactttcgctcacgagactatgggttgggttagacaggctccaggtaaaggattggaatg
 ggtttccacattccaccagatggtcaagatccattctacgctgactccgtaaggggaagattcactatc
 tccagagacaactccaagaacactttgtacttgcagatgaactccttgagagctgaggatactgctgttt
 accactgtgctttgttgccaaagagaggaccttgggttgattactggggacagggaaactttggttactgt
 ttcttcc

Sequência AA Correspondente

evqllesggglvqpggsrlrlscaasgftfahetmvvvrqapgkglewvshippdgqdpfyadsvkgrfti
 srdnsknltlylqmnsiraedtavyhcallpkrgpwwfdywgqgtlvtvss

• 74,1 % de identidade de sequência de nucleotídeos à sequência WT

	1	50
Dom1h-131-206 Otimizada pelo códon	(1)	GGGTTCAATTG
Dom1h-131-206 WT	(1)	GGGTTCAATTG
Consenso	(1)	GAGGT CA TCTTGA TC GG GG GG TGGT CA CCTGG GG TC
		51 100
Dom1h-131-206 Otimizada pelo códon	(51)	TTTCAATG
Dom1h-131-206 WT	(51)	TTTCAATG
Consenso	(51)	TG G T TCTGTGC GC TCCG II AC IT GC CA GAGAC A
		101 150
Dom1h-131-206 Otimizada pelo códon	(101)	GGTTTGGT
Dom1h-131-206 WT	(101)	GGTTTGGT
Consenso	(101)	GGTT TGGT G CAGGC CCAGG AA GG T GA TGGGT TC CA
		151 200
Dom1h-131-206 Otimizada pelo códon	(151)	ATCCGC
Dom1h-131-206 WT	(151)	ATCCGC
Consenso	(151)	ATCC GC GATGGICA GATCC TTCTACGC GACTCCGT AAGGG G
		201 250
Dom1h-131-206 Otimizada pelo códon	(201)	ATTCAT
Dom1h-131-206 WT	(201)	ATTCAT
Consenso	(201)	ATTC ATTC G GACAA TCCAAGAACAC T TA TCCA ATGA
		251 300
Dom1h-131-206 Otimizada pelo códon	(251)	ACAGC
Dom1h-131-206 WT	(251)	ACAGC
Consenso	(251)	AC C TG G GC GAGGA AC GC GT TA CACTGTGC TG T CC
		301 350
Dom1h-131-206 Otimizada pelo códon	(301)	AAGAG
Dom1h-131-206 WT	(301)	AAGAG
Consenso	(301)	AAGAG GG CTTTGGTTGA TACTGGGG CAGGGAAC TGGT AC GT
		351 363
Dom1h-131-206 Otimizada pelo códon	(351)	TCTTC
Dom1h-131-206 WT	(351)	TCTTC
Consenso	(351)	TC C

Sequência 2 Otimizada pelo Códon

Sequência de DNA

10

gagaaaagagaggttcaattgcttgaatctggaggaggtttgggtccagccaggaggggtcccttcgactaa
 gttgtgctgccagtggggtttacgtttgctcatgaaactatggatgggtccgacagggcacctggtaagg
 tcttgaatgggtttcacatatccctccagacgggtcaagaccattttacgctgattccgtgaaaggcaga
 tttaacaatttcacgagataattctaaaaacaccttgtaacttacaatgaactcattgagagctgaggaca
 ctgcagtttatcactgcgctttactaccaaacgtggaccttggtttgattattggggccaaggtacggt
 agtgactgttagttct

Sequência AA Correspondente

ekrevqllesggglvqpggsrlscaasgftfahetmvwvvrqapgkglewvshipdgdqdpfyadsvkgr
 ftisrdnskntlylqmnsraedtavyhcallpkrpwwfdywgqgtlvtvss

• 71,1 % de identidade de sequência de nucleotídeos à
 sequência WT.

Domlh-131-206 WT	(1)	-----GAGGTGGAGCTETGAGTCTGGGGGCGCTTAAAGG	
Pichia MFa 206 somente dAb	(1)	CAGAAAAGAGAGGCTTCAATTGCTTGAATCTGGAGGAGGTTTGGTCCAGCC	
Consenso	(1)	GAGGT CA TG T GA TCTGG GGAGG ITGGT CAGCC	
		51	100
Domlh-131-206 WT	(42)	TGGGGTTCCTGGTTTCTCCCTTCAAGCTCCGATTCCTTTCG	
Pichia MFa 206 somente dAb	(51)	AGGAGGTTTCTTCACTAAGTGGTCTTCAAGTGGTTTGGTTT	
Consenso	(51)	GG GGTCCCT CG CT TGIGC GCC GG TT AC TTTC C	
		101	150
Domlh-131-206 WT	(92)	ATGAGGAGATGGGTCCTTCCGAGGAGGAGGGGTTAAGGG	
Pichia MFa 206 somente dAb	(101)	ATGAAATAGGTAAGGTCGAGGAGGAGGAGGTTAAGG	
Consenso	(101)	ATGA AC ATGGT TGGGTCG CAGGCACC GG AA GGTCT GA TGG	
		151	200
Domlh-131-206 WT	(142)	CTCAACATATTCCGGATTTAGTTCCTTCCTGATCTCT	
Pichia MFa 206 somente dAb	(151)	CTTCAAGGCTCTCAGACCTTCAAGCATACTTGGTTTCT	
Consenso	(151)	GT TCACATAT CC CC GA GGTCA GA CC TT TACGC GA TCGT	
		201	250
Domlh-131-206 WT	(192)	GAAGGTCGGTCCCTCTCTCCGACAACTCAGAGGAGGCAATC	
Pichia MFa 206 somente dAb	(201)	GAAGGTCAGATTCAATTTCAAGATATCTTAAACACTCTGTCT	
Consenso	(201)	GAA GGC G TT AC AT TC CG GA AATTC AA AACAC T TA	
		251	300
Domlh-131-206 WT	(242)	TGGAAAGATAGCCGCTTCCGAGGAGACAGGGAATGGGTTGG	
Pichia MFa 206 somente dAb	(251)	TACAAATGACTCATYAGAATTCAGACTTCACTTATATATCCCT	
Consenso	(251)	T CAAATGAAC TG G GC GAGGACAC GC GT TACTACTG GC	
		301	350
Domlh-131-206 WT	(292)	CTGTTCTAAGAGGGGCTTAAATTCCTCCCTTGGAAATCC	
Pichia MFa 206 somente dAb	(301)	TTATTAACAACCTGAGCTTGGTTTATTTATGGCCCAATAGGT	
Consenso	(301)	T CT CC AA G GG CCTTGGTTGA TA TGGGG CA GG AC T	
		351	367
Domlh-131-206 WT	(342)	GCTCCCTCTCCAGG-	
Pichia MFa 206 somente dAb	(351)	ACTGACTCTTAACTTT	
Consenso	(351)	GT AC GI T G C	

Sequência 3 Otimizada pelo Códon

5

Sequência de DNA

gaagtgcagcttcttgaaagtggaggggctagtgcagccagggggatctttaagattatcatgcgctg
 ccagtggtttacttttgctcacgagacgatggtctgggtgagacaagctcctggaaaaggttttagagtg
 ggtttctcacattccacctgatgggtcaagatcctttctacgcagattccgtcaaggaagatttactatc
 tccagagataatagtaaaaacactttgtacctacagatgaactcacttagagccgaagataccgctgtgt
 accactgcgccttgttgccaaagagaggtccttgggtcgattactggggtcagggtactctggttacagt
 ctcactc

Sequência AA Correspondente

evqllesggglvqpggsrlscaasgftfahetmvwvvrqapgkglewvshipdgdqdpfyadsvkgrfti
 srdnskntlylqmnsraedtavyhcallpkrpwwfdywgqgtlvtvss

• 72,6 % de identidade de sequência de nucleotídeos à

sequência WT.

		1	50
Domlh-131-206 WT	(1)	GAAGTACAACTGCTGGAGTCTTGGGAACTGGTAACCTTGGGCGT	
Pichia Pre 206 somente dAb	(1)	GAAGTACAACTGCTTGAAGTCTTGAAGCTAGTGTACCAATGATC	
Consenso	(1)	GA GTGCAGCT T GA TGG GGAGG T GT CAGCC GGGGG TC	
		51	100
Domlh-131-206 WT	(51)	CCTGGCTCCCTCTCTTACAGATCCAGATCCCTTGGATGAGAGG	
Pichia Pre 206 somente dAb	(51)	TTTAAATATATCAACCTTCCAGTGGATTAATCTTCTACCTATACA	
Consenso	(51)	T G T TC TG GC GCC GGATT AC TITGC CA GAGACGA	
		101	150
Domlh-131-206 WT	(101)	TGGTGGGTGGGAGCAACAGGAGGATCCAGAGTGGTCTCACT	
Pichia Pre 206 somente dAb	(101)	TGGTGGGTGGGAGCAACAGGAGGATCCAGAGTGGTCTCACT	
Consenso	(101)	TGGT TGGGT G CA GC CC GG AA GGT TAGAGTGGGT TC CA	
		151	200
Domlh-131-206 WT	(151)	ATTCCAGCTTGGTGGGAGGATCCCTTGGTGGGAGGAGGAGGAGG	
Pichia Pre 206 somente dAb	(151)	ATTCCAGCTTGGTGGGAGGATCCCTTGGTGGGAGGAGGAGGAGG	
Consenso	(151)	ATCC CC GATGGTCA GATCC TTCTAGCGAGA TCGGT AA GG G	
		201	250
Domlh-131-206 WT	(201)	GTTCACGATGGTGGGAGGATCCCTTGGTGGGAGGAGGAGGAGG	
Pichia Pre 206 somente dAb	(201)	ATTTATATATACAAATAGAGTAAAGATTGGTGGTGGGAGGAGG	
Consenso	(201)	TT AC ATCTCC G GA AAT AA AACAC T TA CT CA ATGA	
		251	300
Domlh-131-206 WT	(251)	ACAGCTGGCTGGGAGGAGGATCCCTTGGTGGGAGGAGGAGGAGG	
Pichia Pre 206 somente dAb	(251)	ACTCAATAGAGGAGGATCCCTTGGTGGGAGGAGGAGGAGGAGG	
Consenso	(251)	AC CT G GCCGA GA AC GC GT TA CACTG GC TG T CC	
		301	350
Domlh-131-206 WT	(301)	AAGAGGGCTGGTGGGAGGATCCCTTGGTGGGAGGAGGAGGAGG	
Pichia Pre 206 somente dAb	(301)	AAGAGGGCTGGTGGGAGGATCCCTTGGTGGGAGGAGGAGGAGG	
Consenso	(301)	AAGAG GG CCTTGGT GA TACTGGGGTCAGGG AC CTGGT AC GT	
		351	
Domlh-131-206 WT	(351)	CTCGGG-	
Pichia Pre 206 somente dAb	(351)	CTC-ATCT	
Consenso	(351)	CTC A C	

Sequência 4 Otimizada pelo Códon

Sequência de DNA

gaagtacaactgctggagagcgggtggcggcctggttcaaccgggtggttccctgcgctgtcctgtgegg
 catctggtttcaccttcgcacacgaaaccatggtgtgggttcgccaaagctcggggcaaaggcctggaatg
 ggt aagccacattcctccagatggccaggaccattctatgcgattccggt aagggtcgcttaccatt
 tctcgtgataactccaaaaacaccctgtacctgcagatgaactccctgcgcgccgaggatactgcgggtgt
 accattgtgcgctgctgcctaaccgtggcccgtggttcgattactggggtcagggactctgggtcaccgt
 aagcagc

Sequência AA Correspondente

evqllesggglvqpggsrlrlscaasgftfahetmwwvrqapqkglewvshipdggdpfyadsvkgrfti
 srdnsknltlylqmnsbraedtavyhcallpkrgpwwfdywgqgtlvtvss

• 76,5 % de identidade de sequência de nucleotídeos à sequência WT.

		1	50
Dom1h-131-206 WT	(1)	AGGGGAGGCTTTCAGTCTCGGGAACTTGGTGGAGCTCGGGGTC	
Ecoli Sec 206 somente dAb	(1)	CAATTAACAATCCAGAGAGCGATCCAGCCAGTCAAGGGTCTCTC	
Consenso	(1)	GA GT CA CTG TGGAG GG GG GGC TGGT CA CC GG GG TC	
		51	100
Dom1h-131-206 WT	(51)	CGTGGTTCCTGGTGGAACTCCATTCATCAATTCAGCATAGGCGA	
Ecoli Sec 206 somente dAb	(51)	GGTGGCCGGTGGTGGGAAATTTTTCCTCCAGACCAAAACC	
Consenso	(51)	CCTGGG CT TCGTGGC GC TC GG TTCACCTT GC CA GA AC A	
		101	150
Dom1h-131-206 WT	(101)	TGTTTTCCTCCAGGCAATAAGGAGGTAAAGTCTCTCAAT	
Ecoli Sec 206 somente dAb	(101)	GGTGGTGGTGGTGGAACTGGGCAAACTGGAAAGGAAAGGAC	
Consenso	(101)	TGGTGGGGT CGCCA GC CC GG AA GG CT GA TGGGT CA	
		151	200
Dom1h-131-206 WT	(151)	AATCCGGGCTTTCAGTATTCCTGACCAAGCAAGGTAAGGCGC	
Ecoli Sec 206 somente dAb	(151)	ATTCCCAAACTCCAGGACCAATTAATGGATTCCTTAAGTTC	
Consenso	(151)	ATTCC CC GATGG CAGGA CC TTCTA GC GA TCCGT AAGGG CG	
		201	250
Dom1h-131-206 WT	(201)	GTCCTCCCTCCCTCCACACTTTCAGAACAGGTAATTCAGAGG	
Ecoli Sec 206 somente dAb	(201)	CTTATCATTTTTCATACCTGCAAAAGCTGTGCCCTAGAGAA	
Consenso	(201)	TT ACCAT TC CG GA AA TCCAA AACAC CT TA CTGCA ATGA	
		251	300
Dom1h-131-206 WT	(251)	CAGTGGTTCAGGACCAAACTGTAATCCGCAAGGCTTTC	
Ecoli Sec 206 somente dAb	(251)	ATCCCTCCCTCCAGGTAATTCAGAACCATTCAGGCAAGGCT	
Consenso	(251)	AC CCTGGG GCCGAGGA AC GCGGI TA CA IGTCGCTGCT CCT	
		301	350
Dom1h-131-206 WT	(301)	AGGAGGAGGTTCCTTACCAATTCAGGTAAGGCTTTC	
Ecoli Sec 206 somente dAb	(301)	AACCTCCCTCCAGGTAATTCAGAACCATTCAGGCAAGGCT	
Consenso	(301)	AA G GG CC TGGTI GA TACTGGGGTCAGGG AC CTGGTCACCGT	
		351	
Dom1h-131-206 WT	(351)	CTCGG	
Ecoli Sec 206 somente dAb	(351)	AAGCA	
Consenso	(351)	AGC	

Sequência 5 Otimizada pelo Códon

Sequência de DNA

gaggttcaactgctggaatctggtggtggtctggtacaaccgggtggttccctgctctgagctgtgcag
 cctctggtttcaccttcgctcatgagaccatggtttgggtacgccaggctccgggtaaggcctggagtg
 ggtaagccatatacctcctgatggtcaggaccggtctatgctgattccgtcaaaggccggtttaccatt
 tctcgtgacaacagcaaaaactctgtacctgcaaatgaactccctgctgagagacacggcggttt
 atcactgtgcaactgctgcaaaaacgcgcccttggttcgactactggggccagggtactctggtcactgt
 atcttct

5

Sequência AA Correspondente

evqllesggglvqpggsrlrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshipdggdpfyadsvkgrfti
 srdnskntlylqmnsiraedtavyhcallpkrgpwwfdywgqgtlvtvss

espectrometria de massa. Tipicamente 3 séries de seleção foram realizadas com a utilização de níveis de redução do antígeno em cada série a seguir.

As séries das seleções foram examinadas por ELISA de fago quanto à presença de clones de ligação anti-TNFR1. O DNA foi isolado destas seleções de fato e subclonado em um vetor de expressão quanto à expressão de fragmentos de dAb solúveis. Fragmentos de dAb solúveis foram expressos em placas de 96 reservatórios e os sobrenadantes foram usados para testar quanto à presença de dAbs de ligação anti-TNFR1, ou com o uso de um ELISA de ligação direta com detecção anti-c-myc iy BIAcore® com o uso de um fragmento BIAcore® de TNFR1 de estreptavidina/biotinilado e classificados de acordo com índices de dissociação.

As moléculas de derivação, descritas abaixo, foram derivadas do dAb precursor, designado DOM1h-131 (apresentado na WO 2006/038027). Esta molécula foi selecionada da biblioteca de apresentação de fago após 3 séries de seleções com o uso de 60 nM do antígeno biotilado. Contas Dyna revestidas de estreptavidina ou neutravidina foram alternadas como reagentes de captura em cada série da seleção, para impedir a seleção de aglutinantes em relação ou à estreptavidina ou à neutravidina. A potência do DOM1h-131 de derivação neste estágio foi na faixa micromolar baixa como determinado no ensaio de células de dispensação de fibroblasto/IL-8 MRC-5. As cinéticas de ligação determinadas por BIAcore® tipicamente apresentaram índices fast-on/fast-out. Os níveis de expressão de *E. coli* deste molécula de derivação DOM1h-131, como um monômero rotulado myc de terminal C o foram na região de 8 mg/litro.

25 Maturação de Afinidade das Derivações:

DOM1h-131-20 foi favorecido na maturação de afinidade para gerar mutantes com potência mais elevada e características biofísicas melhoradas (ver a Figura 3 quanto às sequências de aminoácidos de derivações originadas de DOM1h-131). Após a geração de uma biblioteca

propensa a erro (número médio de mudança de 1 aminoácido por sequência de dAb, tamanho da biblioteca de 8×10^7) com o uso de polimerase de PCR propensa a erro (Genemorph II, Stratagene), sete séries de seleção utilizando estas bibliotecas propensas a erro foram realizadas. Esta estratégia levou ao isolamento do clone DOM1h-131-8, uma molécula em que as mudanças de 4 aminoácidos (um na estrutura 1 (FR1), um no CDR1, um no CDR3 e um no FR4) deram um melhoramento aproximado de 100 vezes na potência medida pelo ensaio de células MRC-5 (~ 4 nM). Neste ensaio, as células MRC-5 foram incubadas com as amostras de teste por uma hora, depois TNF- α (200 pg/ml) foi adicionado. Após uma incubação durante a noite, a dispensação de IL-8 foi determinada com o uso de um ensaio de detecção celular ABI 8200 de IL8 (FMAT). Uma curva de dose de TNF- α foi incluída em cada experiência. A concentração de TNF- α usada para competir com a ligação do dAb ao TNFR1 (200 pg/ml) foi aproximadamente de 70 % da resposta de TNF- α máximo neste ensaio.

De modo a ainda melhorar a potência, as posições únicas de aminoácidos foram diversificadas por mutagênese oligo-dirigida nas posições chaves sugeridas pela informação de consenso de derivação propensa a erro. Durante este processo, uma versão melhorada do clone de DOM1h-131-8, o DOM1h-131-24 (originalmente denominado DOM1h-131-8-2 antes da correção) foi isolado através da triagem de BIAcore[®] que tinha a mutação única de aminoácidos K94R (numeração de aminoácidos de acordo com Kabat) e uma potência de RBA de 200 a 300 pM.

Outras bibliotecas propensas a erro com base nesta diversificação, e a biblioteca de NNS da qual ela foi derivada, foram geradas e submetidas a três séries de seleções de fato com o uso de tratamento térmico (quanto ao método, ver Jaspers, L. *et al.*, *Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. Nat Biotechnol.* setembro de 2004; 22(9): 1161-1165). Durante esta seleção, as bibliotecas foram

reunidas e os clones derivados da série dois da seleção produziram dAbs tais como o DOM1h-131-53 que foram considerados serem mais estáveis ao calor. Foi suposto que estes clones deveriam possuir melhores características biofísicas. Algumas mutações da estrutura no DOM1h-131-53 do clone foram submetidos à linha germinativa para gerar o clone DOM1h-131-83. Este clone formou a base para outra diversificação através da mutagênese de CDR individual oligo-dirigida ou com o uso da seleção de apresentação de fago como descrito acima ou com o uso da tecnologia de compartimentalização *in vitro* com o uso de emulsões. A estratégia de apresentação de fago gerou as diversificações DOM1h-131-117 e DOM1h-131-511.

Neste estágio, estas três diversificações foram comparadas nos ensaios biofísicos e biológicos e a DOM1h-131-511 foi a molécula com as melhores propriedades. Além disso, estas moléculas foram testadas quanto à sua resistência à clivagem proteolítica na presença de tripsina ou leucozima. A leucozima consiste em esputo aglomerado de pacientes com fibrose cística e contém altos níveis de elastase e outras proteases, e foi usada como um substituto para as condições *in vivo* nas doenças pulmonares. Estes dados indicaram que todas as três diversificações DOM1h-131-117, DOM1h-131-151 e DOM1h-131-511 foram rapidamente degradadas na presença de tripsina ou leucozima. Esta descoberta levantou preocupações acerca da persistência *in vivo* do DOM1h-131-511 quando no paciente, e a estratégia foi desenvolvida para seleção quanto à resistência melhorada à tripsina. Foi suposto que tal resistência à tripsina melhorada poderia ter um efeito benéfico sobre outras propriedades biofísicas da molécula. Essencialmente, o método de seleção de fago padrão foi modificado para levar em conta a seleção na presença de proteases antes da seleção no antígeno. Para este fim, um novo vetor de fago foi engendrado, no qual o rótulo c-myc foi deletado para possibilitar seleções na presença de tripsina, sem clivar o dAb apresentado fora do fago. O DOM1h-131-511 com base nas bibliotecas propensas a erro

foi gerado e clonado no vetor pDOM33 (ver a Figura 50 quanto ao mapa do vetor pDOM33). Os estoques de fago gerados desta biblioteca foram pré-tratados ou com 1 mg/ml ou 100 µg/ml de tripsina em 37 °C durante 24 horas. Subsequentemente o inibidor da protease, que foi dos Inibidores de Protease Completa de Roche (2x), foi adicionado para bloquear a atividade da tripsina antes da seleção sobre o antígeno relevante. Quatro séries de seleção foram realizadas. Os dAbs de ligação a TNFR1 expressos solúveis foram avaliados usando o BIAcore® quanto à sua capacidade de ligar-se ao TNFR1 com ou sem a presença das proteases durante uma hora ou incubações durante a noite em 37 °C na presença ou ausência de tripsina (em 100 µg/ml ou 1000 µg/ml de concentração final da tripsina).

Isto levou ao isolamento de duas moléculas de diversificação DOM1h-131-202 e DOM1h-131-206, que demonstraram resistência à protease melhorada como mostrado pelas experiências de ligação a antígeno de BIAcore®. É interessante observar que o DOM1h-131-202 continha apenas uma mutação em CDR2 (V53D), (toda a numeração de aminoácidos de acordo com Kabat) em comparação com DOM1h-131-511, enquanto o DOM1h-131-206 continha apenas duas mutações: uma primeira mutação é a mesma do DOM1h-131-202 (mutação V53D em CDR2) e a segunda é uma mutação Y91H em FR3 (ver Figura 3). Esta mutação Y91H em FR3 ocorre no gene da linha germinativa humana 3-20, indicando que este resíduo ocorre nos anticorpos humanos. Os três clones DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 e DOM1h-131-206 têm sequências de aminoácidos, como mostrado na Figura 3.

A atividade das Moléculas foi determinada como abaixo:

Avaliação da afinidade de ligação do BIAcore® dos DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 e DOM1H-131-206 para ligar-se ao TNFR1 humano.

As afinidades de ligação dos DOM1H-131-202, DOM1H-131-

511 e DOM1H-131-206 para ligação ao TNFR1 humano expresso em *E. coli* recombinante humano foram avaliadas pela análise de BIAcore®. A análise foi realizada com o uso do TNFR1 humano biotinizado. 1400 RU de TNFR1 biotinizado foram aplicados a um fragmento de estreptavidina (SA). A superfície foi regenerada de volta à linha de referência com o uso de condições de eluição ácida branda. DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 e DOM1H-131-206 foram passados através desta superfície em concentrações definidas com o uso de uma taxa de fluxo de 50 µl/minuto. O trabalho foi realizado em uma máquina BIAcore® 3000 e os dados foram analisados e ajustados ao modelo de ligação de 1:1. Os dados de ligação se ajustaram bem ao modelo de ligação 1:1 para todas as moléculas testadas. Todos os valores de K_D foram calculados das taxas de k_{ligado} e $k_{desligado}$. Os séries de BIAcore® foram realizadas em 25 °C.

Os dados abaixo foram produzidos de três experiências independentes. Em cada experiência, os resultados foram calculados pela média de vários ajustes com o uso das concentrações mais elevadas de dAb para kd, e concentrações mais baixas para ka. Os dados são apresentados como a média e desvio padrão (entre parênteses) dos resultados (Tabela 1).

Tabela 1: Dados do BIAcore® para a ligação de DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 e DOM1H-131-206 ao TNFR1 humano

	k_{on}	k_{off}	KD (nM)
DOM1H-131-511 (511)	5,03E+05 (1,07E+05)	5,06E-04 (1,01E-04)	1,07 (0,44)
DOM1H-131-202 (202)	1,02E+06 (2,69E+05)	5,42E-04 (3,69E-05)	0,55 (0,11)
DOM1H-131-206 (206)	1,55E+06 (3,57E+05)	7,25E-04 (1,95E-04)	0,47 (0,06)

Os DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 e DOM1H-131-206 ligaram-se de forma semelhante e com alta afinidade ao TNFR1 humano. Os DOM1H-131-202 e DOM1H-131-206 ligaram-se com afinidades médias de 0,55 nM e 0,47 nM, respectivamente. Tanto o DOM1H-131-202 quanto o DOM1H-131-206 têm uma afinidade levemente melhor em comparação com

o DOM1H-131-511, o qual tem uma afinidade média de 1,07 nM.

Ensaio de ligação do receptor:

A potência dos dAbs foi determinada em relação ao TNFR1 humano em um ensaio de ligação do receptor. Este ensaio mede a ligação do TNF-alfa ao TNFR1 e a capacidade do dAb solúvel para bloquear esta interação. A fusão do TNFR1-FC é capturada sobre uma conta pré-revestida com IgG anti-humano de cabra (H&L). As contas revestidas com o receptor são incubadas com TNF-alfa (10 ng/ml), dAb, anti-TNF-alfa conjugado com biotina, e estreptavidina alexa flúor 647 em uma placa de 384 reservatórios de fundo claro e lados negros. Após 6 horas, a placa é lida no sistema de Detecção Células ABI 8200 e a fluorescência associada às contas é determinada. Se o dAb bloqueia a ligação do TNF-alfa ao TNFR1, a intensidade fluorescente será reduzida.

Os dados foram analisados com o uso do programa (software) de análise ABI 8200. Os valores do efeito da concentração de curvas e potência (EC_{50}) foram determinados com o uso do GraphPad Prism e uma curva de resposta de dose sigmóide com inclinação variável. O ensaio foi repetido em três ocasiões separadas. Uma curva de dose de TNF-alfa foi incluída em cada experiência (Figuras 38 e 39). A concentração do TNF-alfa usado para competir com a ligação do dAb ao TNFR1 (10 ng/ml) é de aproximadamente 90 % da resposta máxima de TNF-alfa neste ensaio.

Um gráfico representativo é mostrado na Figura 30, que apresenta a capacidade dos dAbs de inibir a ligação do TNF-alfa ao TNFR1. Em todas as três experiências, as amostras de controle negativo (HEL4, um dAb de lisozima anti-clara de ovo de galinha e V_H placebo) inibem fracamente a interação entre o TNF-alfa e o TNFR1 em altas concentrações. Os valores médios da potência (EC_{50}) para as amostras de teste e controles positivos (mAb anti-TNFR1 obtido da R&D Systems, mAb225) e Enbrel[®] (etanercept; uma fusão dimérica consistindo de TNFR2 ligado à porção de Fc

do IgG1; licenciado para o tratamento da artrite reumatóide) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores da potência (EC_{50}) para DOM1H-131-202, DOM1H-131-206 e DOM1H-131-511 em um ensaio de ligação do receptor de TNFR1 para três experiências de repetição.

Amostra	Média EC_{50} (nM).	SEM
DOM1H-131-202	0,11	0,008
DOM1H-131-206	0,07	0,01
DOM1H-131-511	0,19	0,01
Enbrel TM (Etanercept)	0,20	0,07
Anti-TNFR1 mAb # mAb225	0,08	0,003

Neste ensaio, DOM1H-131-206 aparece mais potente do que os outros dois dAbs que estão sendo testados, e tem uma potência similar ao mAb anti-TNFR1 comercialmente disponível (R e D Systems).

A expressão dos clones de diversificação de *Pichia pastoris* foi realizada como descrito abaixo:

A sequência de aminoácidos primária das três moléculas de diversificação foi usada para produzir genes otimizados pelo códon para expressão secretada em *Pichia pastoris*. Existe 75 % de identidade de sequência entre o códon otimizado e o códon não otimizado DOM1H-131-206. Os três genes sintéticos foram clonados no vetor de expressão pPIC-Z α (da Invitrogen) e depois foram transformados em duas cepas de *Pichia*, X33 e KM71H. As células transformadas foram plaqueadas nas concentrações crescentes de Zeocina (100, 300, 600 e 900 μ g/ml) para selecionar clones com integrantes múltiplos. Aproximadamente 15 clones para cada linhagem e construção celulares foram selecionados para a triagem da expressão. Como a correlação entre o número elevado/baixo de cópias de genes e o nível de expressão não é completamente entendida em *Pichia pastoris*, vários clones foram selecionados através da faixa de concentração de Zeocina. As séries do fermentador de 5 litros foram realizadas com o uso de clones que não haviam sido extensivamente testados quanto à alta produtividade. Isto possibilitou a produção de quantidades significativas de material para outros estudos.

Produção de material para caracterização protéica:

As resinas da cromatografia com base na proteína A foram extensivamente usadas para purificar dAbs V_H dos sobrenadantes da cultura microbiana. Embora isto possibilite um método de purificação de etapa única para produzir material de alta pureza, usualmente >90 % na maioria dos casos, quanto a algumas moléculas as condições de eluição de baixo pH, podem resultar na formação de agregados. Existe também a questão da capacidade limitada de resinas de afinidade para os dAbs; isto deve significar o uso de quantidades significativas de resina para o processo dos fermentadores. De modo a produzir material de alta qualidade para caracterização e ainda estabilidade e estudos do nebulizador, um processo de purificação de jusante foi planejado com o uso de uma resina de indução de carga modal misturada como a etapa de captura primária, seguida por troca de ânions. Sem otimização significativa, isto possibilitou a recuperação de ~70 % do dAb expresso em uma pureza de ~95 %.

Para a etapa de captura na resina de indução de carga modal misturada, Capto MMC da GE Healthcare, o equilíbrio da coluna é realizado com o uso de fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, e o sobrenadante é carregado sem qualquer necessidade quanto ao ajuste da diluição ou do pH. Após a lavagem da coluna, a proteína é eluída por gradiente de pH com o uso de um tampão de eluição, o qual é Tris 50 mM, pH 9,0. As condições específicas de lavagem e gradiente variarão levemente, dependendo do pI da proteína sendo eluída.

O pico do eluído é então ainda purificado com uma etapa de fluxo atravessante com o uso de cromatografia de troca de ânions. Isto remove a contaminação de HMW residual, tal como a álcool oxidase, e reduz a endotoxina. A resina é equilibrada ou com PBS ou com tampão de fosfato em pH 7,4, sem sal. Após a carga do eluído de Capto MMC sobre a resina de troca de ânions, o dAb não liga e é recuperado do fluxo atravessante. A

endotoxina e outros contaminantes se ligam à resina. A presença de sal, se se estiver usando tampão de PBS, melhora a recuperação da proteína em 91 % para esta etapa, ao invés da recuperação dos 86 % obtidos sem o sal. Entretanto, a presença de sal reduz a eficácia da remoção de endotoxina, de tal modo que um nível típico de dAb da endotoxina, em seguida a esta etapa com a inclusão de sal, foi medido como 58 EU/ml em comparação com um nível de < 1,0 EU/ml obtido quando nenhum sal se achava presente.

Caracterização protéica:

O material produzido das séries do fermentador de 5 litros foi caracterizado quanto à identidade com o uso de espectrometria de massa de eletropulverização, sequenciação de terminal amino e focalização isoelétrica, e quanto à pureza com o uso de SDS-PAGE, SEC e kit de manchamento de glicoproteína Gelcode (Pierce).

Identidade:

A análise de sequência de terminal amino dos primeiros cinco resíduos de cada proteína, foi realizada como esperado (EVQLL...). A espectrometria de massa foi realizada sobre amostras das proteínas que haviam sido trocadas em tampão em H₂O:acetoneitrila 50:50 contendo 0,1 % de ácido acético glacial com o uso de Zip-tips C4 (Millipore). A massa medida para cada uma das três proteínas situou-se dentro de 0,5 Da da massa teórica com base na sequência primária de aminoácidos (calculada com o uso de massas médias) quando levando em conta uma diferença de massa de -2 da formação da ligação dissulfeto interna. IEF foi usado para identificar as proteínas com base no seu pI, que foi diferente para cada proteína.

Pureza:

As três proteínas foram carregadas sobre géis de SDS-PAGE não redutores nas quantidades de 1 µg e 10 µg em duplicata. Uma faixa única foi observada em todos os casos. A cromatografia de exclusão de tamanho foi também realizada para demonstrar os níveis de pureza. Quanto à

cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), 100 µg de cada proteína foram carregados sobre uma coluna TOSOH G2000 SWXL fluindo em 0,5 ml/minuto. A fase móvel foi de PBS / 10 % de etanol.

Pesquisa da estabilidade do dAb para seleção de candidatos:

5 Para a indicação de COPD, deve ser necessário liberar o dAb nos pulmões, por exemplo com o uso de um dispositivo nebulizador. Isto deve significar que a proteína pode potencialmente experimentar uma faixa de cisalhamento e estresses térmicos, dependendo do tipo de nebulizador usado, e pode ser submetido a degradação enzimática por proteases no ambiente

10 pulmonar. Foi determinado se a proteína pode ser liberada com o uso deste tipo de dispositivo, a forma de distribuição correta do tamanho de partículas e a permanência funcional em seguida à dispensação do nebulizador. Portanto, a estabilidade intrínseca de cada molécula para uma faixa de estresses físicos foi pesquisada para determinar a estabilidade da linha de referência, e a

15 maioria dos ensaios indicando da estabilidade mais sensível. Como a estabilidade de cada proteína será dependente da solução tampão na qual ela é solubilizada, algum trabalho de pré-formulação foi necessário. Esta informação, tal como tampão, pH, deve também ser para o entendimento da estabilidade da proteína durante o processo de purificação de jusante e a

20 subsequente armazenagem. De modo a caracterizar as mudanças nas moléculas durante a exposição a uma faixa de estresses físicos, uma variação de técnicas analíticas foi usada, tal como a cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), SDS-PAGE e focalização isoeletrica (IEF).

Avaliação da estabilidade da protease dos DOM1H-131-202,
25 DOM1H-131-511 e DOM1H-131-206:

A estabilidade da protease dos DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 e DOM1H-131-206 foi avaliada pela análise de BIAcore[®] da atividade de ligação residual após a pré-incubação por pontos do tempo definidos nos excessos de protease. Aproximadamente 1400 RU de TNFR1

biotinilado foram aplicados a um fragmento de estreptavidina (SA). 250 nM de DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 e DOM1H-131-206 foram incubados com PBS apenas ou com 100 µg/ml de tripsina, elastase ou leucosima por 1, 3 e 24 horas em 30 °C. A reação foi interrompida pela adição de um coquetel de inibidores da protease. As misturas de dAb/protease foram então passadas através do fragmento revestido de TNFR1 com o uso de subtração celular de referência. A superfície do fragmento foi regenerada com 10 µl de glicina 0,1 M, pH 2,2, entre cada ciclo de injeção. A fração de DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 e DOM1H-131-206 ligada ao TNFR1 humano (em 10 segundos) pré-incubada com proteases foi determinada em relação à ligação do dAb sem proteases. As séries de BIAcore[®] foram realizadas em 25 °C.

Os dados foram produzidos de três experiências independentes. O gráfico de barras indica valores médios e as barras de erros indicam desvio padrão dos resultados (quanto aos resultados, ver a Figura 24).

Foi observado que DOM1H-131-202 e DOM1H-131-206 foram apresentados como tendo maior resistência à degradação proteolítica pela tripsina, elastase ou leucosima em comparação com DOM1H-131-511. A diferença entre DOM1H-131-202 e DOM1H-131-206 em comparação com DOM1H-131-511 é muito pronunciada após 1 hora com tripsina e após 3 horas com elastase ou leucosima.

Estabilidade térmica determinada com o uso de DSC:

A fim de se determinar em que pH as moléculas possuíam estabilidade mais elevada, foi usado o calorímetro de varredura diferencial (DSC) para medir as temperaturas de fusão (T_m) de cada dAb em tampão de Britton-Robinson. Como o Britton-Robinson é composto de sistemas de tampão de três componentes (acetato, fosfato e borato), é possível produzir um faixa de pH de 3 a 10 na mesma solução. O pI teórico foi determinado da sequência de aminoácidos primária de proteína. A partir do DSC, o pH em que os dAbs tiveram sua estabilidade térmica intrínseca mais elevada foi

observado ser de pH 7 para DOM1H-131-202 (202), pH 7 a 7,5 para DOM1H-131-206 (206) e pH 7,5 para DOM1H-131-511 (511). Quanto a todo o trabalho de estresse e de estabilidade subsequente, os seguintes pHs foram usados para cada dAb; para o DOM1H-131-202 (202) e o DOM1H-131-206 (206), pH 7,0, e para o DOM1H-131-511 (511), pH 7,5 em tampão de Britton-Robinson. Os resultados acham-se resumidos na Tabela 3, abaixo.

Tabela 3: Resumo do pH e das T_m s dos DOM1H-131-202 (202), DOM1H-131-206 (206) e DOM1H-131-511 (511), determinado por DSC no tampão de Britton-Robinson em 1 mg/ml

DAb	pH que dá maiores estabilidades térmicas intrínsecas	T_m (°C) do dAb no pH dado
DOM1H-131-202 (202)	7,0	68,6
DOM1H-131-206 (206)	7,0-7,5	65,8
DOM1H-131-511 (511)	7,5	58,0

10 Testes da solubilidade intrínseca:

Todos os dAbs de diversificação foram concentrados em concentradores centrífugos Vivaspin (corte de 5K), para determinar sua solubilidade máxima e os níveis de recuperação após a concentração. As experiências foram realizadas em tampão de Britton-Robinson no pH mais estável. Os volumes e as concentrações das amostras foram medidos através de um decurso de tempo e o desvio da concentração esperada foi registrado, assim como o percentual de recuperação da amostra.

20 Foi observado que todas as proteínas puderam ser concentradas em mais de 100 mg/ml no tampão de Britton-Robinson. Tanto DOM1H-131-202 (202) quanto DOM1H-131-206 (206) apresentaram recuperações mais baixas do que o esperado em comparação com o DOM1H-131-511 (511), mas ainda dentro de níveis aceitáveis.

Dispensação dos dAbs de diversificação do nebulizador:

25 Mediante os testes de nebulizadores diferentes e tampões de formulações, foi demonstrado que o dAb poderia eficazmente ser liberado com o uso de uma ampla faixa de dispositivos de nebulização. De forma mais

importante, foi mostrado pela primeira vez que a nebulização do dAb no tampão de formulação produziu a distribuição de tamanho de partículas desejada (em comparação com o uso o percentual de gotículas $< 5 \mu\text{m}$ para dispensação pulmonar eficaz enquanto se mantém a funcionalidade protéica.

5 Isto é ainda descrito abaixo.

Comparação do Desempenho em Vários Dispositivos:

O DOM1h-131-511 (511) foi testado em seis dispositivos nebulizadores compreendendo dois dispositivos de cada dos três principais grupos de nebulizadores para formulações líquidas, isto é, nebulizadores
10 ultra-sônicos, nebulizadores de jato e nebulizadores de malha vibratória. Em cada dispositivo, o dAb foi testado em 5 mg/ml com uma faixa de concentrações de PEG. Para cada amostra, o percentual do tamanho de gotículas $< 5 \mu\text{m}$ foi medido com o uso de um Dispositivo Malvern Spraytek (Malvern Instruments Limited, Reino Unido) e os resultados são mostrados na
15 Figura 35. A estabilidade de cada amostra após ter sido nebulizada, foi avaliada com o uso de SEC para analisar a quantidade de amostra que havia sido dimerizada tanto no material remanescente na cuba quanto no aerossol coletado. Os resultados podem ser observados na Figura 36. Quanto menor a extensão da formação dimérica, maior a estabilidade.

20 A maioria dos dispositivos pode liberar 40 % ou mais da formulação líquida na faixa de tamanho correta, mas os dispositivos eFlow (um dispositivo nebulizador de malha vibratória) e PARI LC (um nebulizador a jato) desempenham-se melhor, com o dispositivo PARI LC* (estrela) liberando mais do que 80 % quando PEG é incluído no tampão. Este aumento
25 na dispensação com PEG é também observado com o eFlow e, em uma menor extensão, com o PARI LC+.

Notavelmente, a atividade do dAb foi também observada ficar retida após a nebulização (ver os resultados na Figura 8).

Efeito dos Aditivos de Tampão:

Tendo em vista a menor estabilidade do DOM1H-131-511 (511), o tampão da formulação de fosfato 50 mM continha tanto PEG 1000 quanto sacarose (e tinha uma viscosidade que se situava dentro da faixa que é definida como aproximadamente igual à viscosidade de uma solução de cerca de 2 % a cerca de 10 % de PEG 1000 em tampão de fosfato 50 mM contendo 1,2 % (p/v de sacarose) para ajudar a proteger o dAb tanto do cisalhamento quanto do estresse térmico. Como tanto o DOM1H-131-202 (202) quanto o DOM1H-131-206 (206) têm T_m 's mais elevadas e apresentaram estabilidade consideravelmente melhorada ao estresse térmico, todas as moléculas foram testadas tanto no tampão da formulação original quanto no tampão de Britton-Robinson (que tem uma viscosidade menor do que o tampão da formulação). Os dAbs foram testados tanto no dispositivo de E-flow quanto no de Pari LC+ no decorrer de 3,5 minutos em uma concentração protéica de 5 mg/ml, e a distribuição de tamanho de partícula determinada com o uso de um Dispositivo Malvern Spraytek. Como comparação, um medicamento comercializado para fibrose cística (designado proteína padrão X) que é liberado com o uso de um dispositivo nebulizador, foi testado em seu próprio tampão de formulação. Os resultados são mostrados na Figura 37. Para a boa dispensação e distribuição no pulmão inferior, o tamanho de partícula ideal é menor do que 6 microns, por exemplo $< 5 \mu\text{m}$. Todos os dAbs fornecem níveis comparáveis de tamanhos de partículas que foram menores do que $5 \mu\text{m}$ tanto no tampão de Britton-Robinson quanto no tampão da formulação (como descrito anteriormente). Entretanto, a viscosidade mais elevada do tampão da formulação pode ser particularmente benéfica para produzir partículas dentro da faixa de tamanho correta, por exemplo partículas $< 5 \mu\text{m}$. A concentração do dAb na cuba do dispositivo foi determinada por medições A_{280} antes e após a nebulização. Foi observado que a concentração protéica não mudou significativamente, indicando que nem a proteína nem o veículo são preferivelmente nebulizados durante a dispensação.

Conclusão:

Foi demonstrado, como descrito acima, que polipeptídeos tais como os dAbs podem ser nebulizados em uma faixa de dispositivos nebulizadores comercialmente disponíveis e, notavelmente, que eles conservam a estabilidade e a atividade biológica após a nebulização, e não existe nenhuma agregação significativa observada em seguida à nebulização. Quando excipientes intensificadores da viscosidade, tais como o PEG, são adicionados à formulação tampão, a distribuição do tamanho de partículas e o tamanho percentual das gotículas de menos do que 5 μm podem ser melhorados, assim potencialmente melhorando a dispensação do dAb ao pulmão inferior.

A dispensação do dAb ao pulmão pode também ser melhorada pelo aumento da concentração do dAb, por exemplo uma concentração de até cerca de 40 mg/ml, e no tempo de dispensação, sem qualquer redução na estabilidade ou atividade do dAb.

EXEMPLO 1**VETOR FAGO pDOM13**

Um vetor de apresentação de fago filamentososo (fd), pDOM13, foi usado. Este vetor produz proteínas de fusão com a proteína II de revestimento de fago. O sítio de clonagem múltipla de pDOM13 é ilustrado na Figura 1. Os genes codificando dAbs foram clonados como fragmentos *SalI/NotI*.

EXEMPLO 2

SELEÇÕES DA PROTEASE DE TESTE NOS ANTICORPOS DE DOMÍNIO DE APRESENTAÇÃO DE FAGO (dAbs) COM UMA FAIXA DE RESISTÊNCIA À TRIPSINA

Os genes codificando dAbs, DOM4-130-54, que liga IL-1R1, DOM1h-131-511, que liga TNFR1, e DOM15-10, DOM15-26 e DOM15-26-501, que ligam VEGFA, foram clonados em pDOM13 e fagos apresentando

estes dAbs, foram produzidos de acordo com técnicas padrão. Os fagos foram purificados pela precipitação de PEG, recolocados em suspensão em PBS e titulados.

Os dAbs acima apresentaram uma faixa de capacidade para resistir à degradação pela tripsina, quando testados como proteínas isoladas. A resistência à degradação foi avaliada como segue: o dAb (1 mg/ml) em PBS foi incubado com tripsina em 40 µg/ml em 30 °C, resultando em uma relação molecular de 25:1 de dAb:tripsina. As amostras (30 µl) foram retiradas imediatamente antes da adição da tripsina, e depois em T = 1 hora, 3 horas e 24 horas. A atividade da protease foi neutralizada pela adição de Inibidores de Protease Completa de Roche (2 x) seguida pela imersão em nitrogênio líquido e armazenagem sobre gelo seco. 15 µg de cada amostra de dAb foram subsequentemente analisados por eletroforese em um gel de Novex 10-20 % de Tricina, e as proteínas foram manchadas com SureBlue (1x).

Tanto o DOM15-10 quanto o DOM15-26-501 foram significativamente digeridos durante as primeiras três horas. O DOM15-26, DOM4-130-54 e o DOM1h-131-511 foram mais estáveis, com a digestão dos dAbs apenas tornando-se evidente após 24 horas (Figura 2).

Os dAbs apresentados em fago foram também incubados na presença de tripsina para se avaliar se a resistência à tripsina dos dAbs apresentados em fago se correlacionada com os resultados obtidos com os dAbs solúveis isolados. Várias concentrações de tripsina e tempos de incubação foram testados. Em todos os casos, após a neutralização da tripsina com Inibidores de Protease Completa de Roche, os fagos foram testados quanto à sua capacidade de ligarem-se a um ligando genérico: proteína A, que se liga a todos os anticorpos do domínio V_H (por exemplo, DOM1h-131, DOM15-26, DOM15-26-501), ou proteína L, que se liga a todos os anticorpos do domínio V_K (por exemplo, DOM4-130-54, DOM15-10). Os fagos foram também testados quanto à ligação aos antígenos alvo. Em ambos os casos, a

ligação foi admitida correlacionar-se com a retenção da integridade estrutural do dAb através da resistência à proteólise. A atividade de ligação foi medida ou por ELISA (com o uso de anticorpos conjugados contra o fago) ou por eluição dos fagos ligados e análise de título em seguida à infecção das células de TG1 de *E. coli* em crescimento exponencial.

TESTES COM DOM15-10, DOM15-26 E DOM15-26-501 NO FAGO

Cada dAb foi tratado por uma hora na temperatura ambiente com uma faixa de concentrações de tripsina (100 µg/ml, 10 µg/ml e 0 µg/ml).

A atividade da tripsina foi bloqueada com o Inibidor de Protease Completa de Roche (1X) e depois os fagos foram diluídos em 2 % de Marvell em PBS, incubados com 50 nM de antígeno biotilado [VEGF humano recombinante (R&D Systems)] por uma hora na temperatura ambiente. Contas revestidas de estreptavidina [Dynabeads M-280 (Invitrogen)] que foram pré-bloqueadas por uma hora na temperatura ambiente com 2 % de Marvell em PBS foram adicionadas, e a mistura foi então incubada por cinco minutos na temperatura ambiente. Todas as etapas da incubação com Dynabeads foram realizadas sobre uma roda giratória. Os fagos não ligados foram removidos por lavagem mediante lavagem das contas por oito vezes com 1 ml de Tween-20 a 0,1 % em PBS. Os fagos ligados foram eluídos com 0,5 ml de Glicina 0,1 M, pH 2,2, e neutralizados com 100 µl de Tris 1 M-HCl, pH 8,0. Os fagos eluídos foram usados para infectar exponencialmente as células TG1 em crescimento (uma hora em 37 °C) e plaqueados sobre placas de Tetraciclina. As placas foram incubadas durante a noite em 37 °C e as contagens das colônias foram feitas (ver a Tabela 4). Os melhores resultados foram observados da seleção com a incubação com 100 µg/ml de tripsina. Houve um aumento de cerca de 10 vezes na produção do DOM15-26 em comparação com o DOM15-10 e DOM15-26-501.

Uma segunda experiência foi feita para ainda confirmar estes

resultados sob condições mais severas de incubação. Os dAbs apresentados no fago foram tratados por 1 hora ou 2 horas em 37 °C com agitação (250 rpm). Os melhores resultados foram observados das seleções com incubação de 2 horas com 100 µg/ml de tripsina. O rendimento do DOM15-26 foi 200 vezes mais elevado do que o rendimento do DOM15-26-501 e 1000 vezes mais elevado do que o rendimento do DOM15-10.

Em uma terceira experiência, os fagos apresentando DOM15-26 e DOM15-26-501 foram misturados a 1:1 na partida. Eles foram então ou incubados com tripsina (1000 µg/ml) ou sem tripsina, por duas horas em 37 °C com agitação (250 rpm), e depois selecionados para ligação a antígeno como descrito acima. A sequenciação de dez colônias de cada seleção revelou uma população mista de clones para seleção sem pré-tratamento de tripsina (DOM15-26: 4/10; DOM15-26-501: 6/10), enquanto todos os clones da seleção com tripsina codificaram para DOM15-26, como esperado.

Estas experiências indicam que uma pressão de seleção pode ser obtida pela adição de uma protease aos fagos apresentando dAbs, de tal modo que os fagos apresentando os dAbs mais proteoliticamente estáveis sejam preferivelmente selecionados (segundo o uso de batéia sobre um ligando genérico ou o antígeno).

Tabela 4

Experimento	Comprimento da incubação	Temp.	Concentração de tripsina	Titulador DOM15-26	Titulador DOM15-26-501	Titulador misturado 1:1	Titulador DOM15-10	
1 entrada 10 ¹⁰	1 h	Temp. amb.	100 µg/ml	1,6x10 ⁸	6,3x10 ⁷		1,1x10 ⁷	
	1 h	Temp. amb.	10 µg/ml	3x10 ⁸	4,4x10 ⁸		2,4x10 ⁸	
	1 h	Temp. amb.	0 µg/ml	0,9x10 ⁸	2x10 ⁸		0,7x10 ⁸	
2 entrada 10 ⁹	1 h, 250rpm	37°C	100 µg/ml	2x10 ⁷	1x10 ⁶			1x10 ⁵
	2 h, 250rpm	37°C	100 µg/ml	1x10 ⁷	6x10 ⁴			1x10 ⁴
	2 h, 250rpm	37°C	0 µg/ml	5,4x10 ⁷	4,1x10 ⁷			3x10 ⁸
3 entrada 10 ¹⁰	2h, 250rpm	37°C	100 µg/ml	2,3x10 ⁸	8x10 ⁵		6,8x10 ⁷	
	2h, 250rpm	37°C	0 µg/ml	3,9x10 ⁸	4,4x10 ⁸		4,8x10 ⁸	

TESTES COM DOM4-130-54 NO FAGO

DOM4-130-54 foi testado em um protocolo semelhante ao

descrito acima. Os parâmetros que variaram foram: concentração da tripsina, temperatura e comprimento da incubação. O uso da batela biológica foi feito em relação a IL-RI-Fc (uma fusão de IL-1RI e Fc) na concentração de 1 nM em PBS. Reduções significativas no título do fato foram apenas observadas após a incubação do fago com 100 µg/ml de tripsina durante a noite em 37 °C (ver a Tabela 5).

Tabela 5

Comprimento da incubação	Temperatura	Concentração de tripsina	Titulador
1hr	Temperatura ambiente	100 µg/ml	1,8 x 10 ¹⁰
1hr	Temperatura ambiente	10 µg/ml	7,2 x 10 ⁹
1hr	Temperatura ambiente	0 µg/ml	6,6 x 10 ⁹
Durante a noite	Temperatura ambiente	100 µg/ml	2,16 x 10 ⁹
Durante a noite	Temperatura ambiente	10 µg/ml	7,2 x 10 ⁹
Durante a noite	Temperatura ambiente	0 µg/ml	7,8 x 10 ⁹
Durante a noite	37°C	100 µg/ml	2,04 x 10 ⁶
Durante a noite	37°C	10 µg/ml	3,84 x 10 ⁸
Durante a noite	37°C	0 µg/ml	7,2 x 10 ⁹

TESTES COM O FAGO DOM1h-131

Os fagos DOM1h-131 (intimamente relacionados ao DOM1h-131-511 pela sequência de aminoácidos) foram tratados com 0 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml e 1000 µg/ml de tripsina por uma hora na temperatura ambiente. A digestão foi inibida pela adição de 25x Inibidores da Protease Completa (Roche). As diluições de 2 vezes em série do fago foram realizadas abaixo de uma placa de ELISA revestida com TNFR1 1 nM, e os fagos de ligação foram detectados com anti-M13-HRP. Os resultados são mostrados abaixo na Tabela 6.

Tabela 6

DOM1h-131				
Concentração de Tripsina				
1 mg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	0 µg/ml	Entrada do fago
0,284	0,418	0,784	0,916	4,51E+ 10
0,229	0,377	0,802	0,944	2,26E+ 10
0,13	0,284	0,860	0,949	1,13E+ 10
0,133	0,196	0,695	0,962	5,46E+ 09
0,114	0,141	0,573	0,946	2,82E+ 09
0,089	0,115	0,409	0,850	1,41E+ 09
0,084	0,084	0,286	0,705	7,05E+ 08
0,080	0,084	0,213	0,577	3,52E+ 08

Estas experiências de teste claramente mostram que 100 µg/ml de tripsina e uma temperatura de 37 °C são apropriados para aplicar uma pressão de seleção sobre fagos apresentando dAbs de vários graus de resistência à proteólise pela tripsina. O tempo de incubação com a protease pode ser otimizado para cada dAb apresentado pelo fago, se desejável.

EXEMPLO 3

SELEÇÃO DA PROTEASE DOS REPERTÓRIOS APRESENTADOS PELO FAGO DOS ANTICORPOS DE DOMÍNIO

Quatro repertórios foram criados com o uso dos seguintes dAbs como moléculas precursoras: DOM4-130-54, DOM1h-131-511, DOM15-10 e DOM15-26-555. Mutações aleatórias foram introduzidas nos genes por PCR usando-se o kit Stratagene Mutazyme II, iniciadores biotinilados e 5 a 50 pg de gabarito para uma reação de 50 µl. Após a digestão com *SalI* e *NotI*, os insertos foram purificados dos produtos não digeridos com contas revestidas de estreptavidina e ligadas em pDOM13 nos sítios correspondentes. Células TB1 de *E. coli* foram transformadas com a mistura de ligação purificada resultando em grandes repertórios de clones resistentes à tetraciclina: $8,5 \times 10^8$ (DOM4-130-54), $1,5 \times 10^9$ (DOM1h-131-511), 6×10^8 (DOM15-10) e 3×10^9 (DOM15-26-555).

As bibliotecas de fago foram preparadas por precipitação dupla com PEG e recolocadas em suspensão em PBS.

Os índices de mutações dos aminoácidos foram de 2,3 e 4,4 para os repertórios DOM1h-131-511 e DOM4-130-54, respectivamente. A funcionalidade foi avaliada pelo teste de 96 clones no ELISA de fago usando reservatórios revestidos com a proteína A ou a proteína L (em 1 µg/ml). 62,5 % e 27 % dos clones mostraram apresentação funcional dos dAbs nos repertórios DOM1h-131-511 e DOM4-130-54, respectivamente.

Os índices de mutações de aminoácidos foram de 2,5 e 4,6 para os repertórios DOM15-10 e DOM15-26-555, respectivamente. A

funcionalidade foi avaliada pelo teste de 96 clones no ELISA de fago com o uso de reservatórios revestidos com a proteína A ou a proteína L (em 1 µg/ml). 31,3 % e 10,4 % dos clones mostraram apresentação funcional dos dAbs nos repertórios DOM15-10 e DOM15-26-555, respectivamente.

5 REPERTÓRIOS DOM4-130-54 e DOM1h-131-511

Quatro séries de seleção foram realizadas com estas bibliotecas para selecionar quanto aos dAbs com resistência melhorada à protease.

10 A primeira série da seleção foi por ligação a antígeno (1 nM ou 10 nM de antígeno) sem tratamento da protease para purificar a biblioteca para remover quaisquer clones que não mais se liguem a antígeno com alta afinidade. As produções da série 1 foram na faixa de 10^8 a 10^{10} (em comparação com uma entrada de 10^{11} de fago), indicando que a maioria da biblioteca ligou-se a antígeno com alta afinidade.

15 Na série 2, o tratamento da protease com 100 µg/ml de tripsina foi introduzido, e as produções foram como mostrado abaixo na Tabela 7.

Tabela 7

Condições de incubação da tripsina	Biblioteca DOM1h-131-511	Biblioteca DOM4-130-54
37°C durante a noite	$1,86 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
37°C 2hrs	$4,8 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$
Temperatura ambiente 2hs	$1,2 \times 10^9$	$4,62 \times 10^9$
Nenhuma tripsina	$\sim 1 \times 10^9$	$\sim 4 \times 10^9$
Nenhum antígeno	$1,8 \times 10^4$	$< 6 \times 10^3$

20 Houve significativa seleção quando os dAbs foram tratados com tripsina em 37 °C durante a noite. Esta produção tomou a frente da série 3, quando os fagos foram tratados ou com 1 mg/ml ou com 100 µg/ml de tripsina em 37 °C por 24 horas. Os títulos da tripsina tratados com os fagos da série 3 foram de 10^5 a 10^6 para o repertório DOM1h-131-511 e de 10^7 a 10^8 para o repertório DOM4-130-154.

25 Todas as produções da série 3 (DOM1h-131-511 e DOM4-130-154 com 1 mg/ml e 100 µg/ml) experimentaram uma quarta série de seleção em relação ao antígeno 1 nM com 100 µg/ml de tripsina. Os títulos

situaram-se na faixa de 10^6 a 10^8 , similar àqueles observados na série 3. Algum enriquecimento foi observado para o repertório DOM1h-131-511, mas nenhum enriquecimento foi observado para o repertório DOM4-130-54.

REPERTÓRIOS DOM15-10 E DOM15-26-555

5 A primeira série da seleção foi realizada com concentração de hVEGF biotilado 2 nM (fator de crescimento endotelial vascular humano) e sem tratamento de protease para purificar a biblioteca para remover quaisquer clones que não mais ligassem o antígeno com alta afinidade. As produções da série 1 foram de cerca de 10^8 (em comparação com uma entrada de 10^{10} fagos para o DOM15-10 e de 10^{11} fagos para o DOM15-26-555) indicando que a maioria da biblioteca ligava o antígeno com alta afinidade.

A segunda e terceira séries da seleção foram realizadas com hVEGF biotilado 2 nM. Antes da lavagem em batela no hVEGF, os fagos foram incubados na presença de tripsina (100 μ g/ml) em 37 °C em uma bateadeira (250 rpm). O tempo de incubação foi de uma hora para o repertório DOM15-10 e de duas horas para o repertório DOM15-26-555.

As produções foram como segue: $1,5 \times 10^6$ e 9×10^5 para a segunda e terceira séries da seleção com o repertório DOM15-10; $2,2 \times 10^8$ e $3,9 \times 10^9$ para as segunda e terceira séries da seleção com o DOM15-26-555.

20 EXEMPLO 4

ANÁLISE DAS PRODUÇÕES DE SELEÇÃO: REPERTÓRIOS DOM4-130-54 E DOM1h-131-511

Todas as produções da série 3 e da série 4 foram subclonadas no vetor pDOM5 e transformadas nas células JM83. O vetor pDOM5 é um vetor com base no pUC119. A expressão das proteínas é conduzida pelo promotor Plac. Uma sequência condutora GAS1 (ver a WO 2005/093074) assegurou a secreção dos Abs solúveis isolados dentro do periplasma e no sobrenadante da cultura de JM83 de *E. coli*. 96 e 72 colônias individuais da série 3 e da série 4 foram aleatoriamente escolhidas para expressão.

12 a 24 clones foram sequenciados de cada produção da série 3 e da série 4. As mutações de consenso foram observadas em ambas as seleções e aproximadamente 25 clones abrigando motivos de consenso foram escolhidos para outra caracterização. As sequências de aminoácidos destes clones são apresentadas na Figura 3 (variantes selecionadas de DOM1h-131-511) e na Figura 4 (variantes selecionadas de DOM4-130-54) e listadas como sequências de DNA nas Figuras 19A a 19L. Os aminoácidos que diferem da sequência precursora nos clones selecionados são realçados (aqueles que são idênticos são marcados por pontos). As alças correspondentes às CDR1, CDR2 e CDR3 são contornadas.

Estes clones foram expressos em uma quantidade maior, purificados na proteína L (para variantes de DOM4-130-54) e na proteína A (para variantes DOM1h-131-511) e testados quanto a ligação a antígenos em BIAcore após incubação de uma hora ou durante a noite em 37 °C na presença ou ausência de tripsina (concentração final de 100 µg/ml ou 1000 µg/ml).

Geralmente, as produções das seleções de DOM4-130-54 foram mais estáveis com a maioria dos clones remanescentes resistentes à tripsina por uma hora, e os melhores clones resistentes durante a noite. Em comparação, um pequeno número de clones das seleções de DOM1h-131-511 foi resistente à tripsina por uma hora, enquanto nenhum dos clones ficou resistente durante a noite.

EXEMPLO 5

ANÁLISE DAS PRODUÇÕES DE SELEÇÃO: REPERTÓRIOS DOM15-10 E DOM15-26-555

A eficácia da seleção com pré-tratamento da tripsina foi primeiro testada em ELISA de fago monoclonal com e sem digestão da tripsina. Dezoito colônias da segunda série de seleção e 24 colônias da terceira série de seleção de cada biblioteca foram retiradas. Os clones

DOM15-10, DOM15-26-501 e DOM15-26 foram usados como controles. Controles adicionais incluíram a solução de fago amplificada e purificada de cada biblioteca após a segunda e a terceira séries de seleção da tripsina.

5 Cada amostra de fago foi dividida em duas frações, a primeira foi tratada com 100 ug/ml de tripsina, a segunda não foi tratada com tripsina. A incubação de ambas as frações foi realizada por uma hora em 37 °C com agitação (250 rpm) e bloqueada pela adição do Inibidor da Protease Completa Roche (1x).

10 O ELISA de fagos foi realizado com o uso das amostras digeridas e não digeridas de tripsina. Os reservatórios do ELISA foram revestidos com neutravidina em tampão de bicarbonato a 0,1 M em uma concentração de 1 µg/ml. Após as etapas de lavagem com PBS e bloqueio dos reservatórios revestidos de antígeno com 1 % de Tween-20 em PBS por uma hora na temperatura ambiente, os reservatórios foram revestidos com hVEGF
15 biotilado diluído em 1 % de Tween-20 em PBS em uma concentração de 100 ng/ml. A seguir, os reservatórios foram lavados com PBS e os sobrenadantes de fago tratados ou não tratados diluídos a 1:1 com 1 % de Tween-20/PBS, foram adicionados. Após 30 minutos de incubação a 37 °C, os reservatórios foram lavados com 1 % de Tween-20/PBS, seguido por uma
20 incubação de 30 minutos em 37 °C com conjugado de fago-HRP anti-M13 (diluído a 1/5000 em 1 % de Tween-20/PBS). Os reservatórios foram então lavados com PBS e peroxidase. A reação foi iniciada pela adição do reagente SureBlue. Após cerca de dez minutos, a reação foi interrompida com um volume equivalente de HCl 1 M e os reservatórios foram lidos em OD_{450nm}.

25 As leituras do ELISA dos controles instáveis DOM15-10 e DOM15-26-501 tratados com tripsina deram uma OD₄₅₀ menor do que 0,404, e este valor foi aceito como um valor limite de um clone instável. Todas as amostras que deram uma OD menor do que 0,404 foram consideradas como sendo instáveis. Todas as amostras acima desse valor foram consideradas

como sendo estáveis.

Tabela 8

Biblioteca	Tripsina		Nenhuma tripsina	
	2 ^a seleção	3 ^a seleção	2 ^a seleção	3 ^a seleção
DOM15-10	33%	89%	100%	100%
DOM15-26-555	94.4%	100%	100%	100%

A Tabela 8 mostra o percentual de clones estáveis após a segunda e terceira séries da seleção de tripsina de cada biblioteca. O enriquecimento dos clones resistentes à tripsina é visível em ambas as bibliotecas após a terceira série da seleção. Os valores dos reservatórios de controle do ELISA contendo a mistura de fagos purificada amplificada após cada seleção foram muito mais elevados do que 0,404 em cada caso após a digestão da tripsina. Além disso, um pequeno aumento no sinal foi observado quando da comparação do fago tratado com tripsina da terceira série de seleção como fago tratado com tripsina da segunda série de seleção. A biblioteca do fago DOM15-10 mostrou um aumento de cerca de 14 % do valor de partida. A biblioteca do fago DOM15-26-555 apresentou um aumento que representa cerca de 2 % do valor de partida.

Especialmente estes resultados mostram que a seleção com pré-tratamento de tripsina foi eficaz para selecionar clones de fato resistentes à tripsina, dos repertórios de DOM15-10 e DOM15-26-555.

Todas as produções das segunda e terceira séries de seleção (DOM15-26-555) e da terceira série de seleção apenas (DOM15-10) foram subclonadas no vetor pDOM5 e transformadas nas células eletrocompetentes HB2151. O vetor pDOM5 é um vetor com base em pUC119. A expressão das proteínas é conduzida pelo promotor Plac. Uma sequência condutora GAS1 garantiu a secreção dos dAbs solúveis isolados no periplasma e no sobrenadante da cultura HB2151 de *E. coli*. 184 colônias individuais de cada série de seleção (3 e 4) foram aleatoriamente selecionadas para expressão em volumes de cultura de 1 ml.

Os sobrenadantes bacterianos foram diluídos em tampão HBS-EP BIAcore buffer (relação em volume de 1:1) e dividido em duplicatas. Tripsina foi adicionada a apenas um frasco em uma concentração final de 20 µg/ml. A incubação foi realizada por 40 minutos em 37 °C com agitação (250 rpm). Após bloquear-se a reação com Inibidor da Protease Completa Roche (1X), tanto a tripsina tratada quanto os sobrenadantes de fago não tratados foram testados em BIAcore 3000 quanto à ligação a antígeno (2.000 RU de hVEGF biotilado em um chip sensor de SA).

Os critérios para selecionar clones foram: uma redução na ligação a antígeno de < 15 % dos dAbs tratados com tripsina em relação aos dAbs não tratados (com base no RU máximo alcançado no ponto do tempo selecionado), o que deve refletir a estabilidade dos dAbs para o tratamento da protease em geral; e a redução da dissociação de < 40 % entre os dois pontos do tempo durante a dissociação de um dAb do antígeno. Com base nestes valores, 60 clones tanto da segunda quanto da terceira séries de seleção da biblioteca de DOM15-26-555, e 17 clones da terceira série de seleção da biblioteca de DOM15-10 foram sequenciados. As mutações de consenso foram observadas nas produções de ambas as bibliotecas, e 17 clones de cada biblioteca abrigando motivos de consenso foram escolhidos para outra caracterização. As sequências de aminoácidos destes clones são mostradas na Figura 5 (variantes selecionadas do DOM15-26-555) e na Figura 6 (variantes selecionadas do DOM15-10), e são listadas como sequências de DNA nas Figuras 20A a 20E. Os aminoácidos que diferem da sequência precursora nos clones selecionados são realçadas (aquelas que são idênticas são marcadas por pontos). As alças correspondentes a CDR1, CDR2 e CDR3 são circundadas por linhas.

Estes clones foram expressos nas culturas de expressão de 50 ml, purificados sobre a proteína A (para as variantes DOM15-26-555) ou a proteína L (para as variantes DOM15-10), diluídos até concentração de 100

nM no tampão HBS-EP e testados quanto à ligação a antífeno em BIAcore após 1,5 hora de incubação em 37 °C, com agitação (250 rpm) na presença ou na ausência de tripsina (concentração final de 20 µg/ml).

Estes clones foram também testados quanto à resistência da tripsina com o uso do método descrito no Exemplo 2. As proteínas eram tampão trocado por PBS e concentrado a 1 mg/ml. 25 µg de proteína foram misturados com 1 µg de tripsina (Prometa) e incubados por 0 horas e 24 horas em 30 °C. Após este tempo, a reação foi bloqueada com Inibidor da Protease Completa Roche (1X), e DTT, assim como o agente de carga foi adicionado. Amostras foram desnaturadas por cinco minutos em 100 °C. Depois, 15 µg de cada amostra foram analisados por eletroforese em géis de Novex 10-20 % de Tricina, e as proteínas foram manchadas com SureBlue (1x).

Geralmente, as produções das seleções do DOM15-26-555 foram mais estáveis, com a maioria dos clones permanecendo resistentes à tripsina por 1,5 hora quando testados em BIAcore durante a noite quando desenvolvidos em SDS-PAGE. Em comparação apenas um pequeno número de clones das seleções de DOM15-10 ficou resistente à tripsina para tratamento noturno quando desenvolvido sobre SDS-PAGE.

EXEMPLO 6

IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE DOM1h-131-511

DOM1h-131-203, DOM1h-131-204 e DOM1h-131-206 foram analisados de mais detalhes. Eles foram comparados no BIAcore em uma concentração de dAb de 500 nM após a incubação com diferentes concentrações de tripsina (variando de 0 a 100 µg/ml) durante a noite em 37 °C. Os traços do BIAcore são mostrados na Figura 7. Os resultados claramente mostram que ambas as variantes são mais resistentes do que sua precursora à proteólise em alta concentração de tripsina (100 µg/ml). Dois dos dAbs, o DOM1h-131-202 e o DOM1h-131-206, foram também comparados juntamente com seu precursor contra uma faixa de outras proteases, incluindo

a leucozima, a elastase e a pancreatina sob as condições acima descritas, com uma concentração de protease de 100 µg/ml. Os dAbs apresentaram resistência aumentada à proteólise, em comparação com o precursor contra todas as proteases tratadas. Os traços do BIAcore quanto à elastase e a leucozima são mostrados na Figura 8.

5 5 µM de cada dAb foram tratados com 100 µg/ml de tripsina de graduação de sequenciação, por 0, 1, 3 e 24 horas. A reação foi inibida com 25X o Inibidor da Protease Completa Roche e as reações foram desenvolvidas em um gel de 4 a 12 % de Novex Bis-Tris. Os géis são mostrados na Figura 9.

EXEMPLO 7

IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE DOM4-130-54

DOM4-130-201 e DOM4-130-202 foram analisados em mais detalhes. Eles foram comparados no BIAcore em uma concentração de dAb de 15 500 nM após a incubação com diferentes concentrações de tripsina (variando de 0 a 100 µg/ml) durante a noite em 37 °C. Os traços do BIAcore são apresentados na Figura 10. Os resultados claramente mostram que todas as três variantes são mais resistentes do que sua precursora à proteólise em altas concentrações de tripsina (100 µg/ml). DOM4-130-201 e DOM4-130-202 foram também comparados com 20 o precursor em relação a uma faixa de outras proteases, incluindo a leucozima, a elastase e a pancreatina, sob as condições descritas acima, com uma concentração de proteases de 100 µg/ml. Não obstante os resultados tenham sido menos evidentes do que com a tripsina, os dAbs de diversificação apresentaram resistência aumentada à proteólise em comparação com o precursor, contra todas 25 as proteases testadas. Os traços do BIAcore para a elastase e a leucozima são mostrados na Figura 11.

5 µM de cada dAb foram tratados com 100 µg/ml de tripsina de graduação de sequenciação, por 0, 1, 3 e 24 horas. A reação foi inibida com 25X o Inibidor da Protease Completa Roche e as reações foram

desenvolvidas em um gel de 4 a 12 % de Novex Bis-Tris. Os géis são mostrados na Figura 9.

EXEMPLO 8

OUTRA CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES DE

5 DOM1h-131-511 E DOM4-130-54

Os dAbs foram primeiramente analisados com o uso da Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) para determinar se o aumento na resistência da tripsina se correlacionava com um aumento na temperatura de fusão (T_m). Um aumento na estabilidade da tripsina se correlaciona com um aumento na T_m (ver a Tabela 9).

TABELA 9

Nome	Temp, °C
DOM1h-131-511	57,9
DOM1h-131-202	67,5
DOM1h-131-203	65,7
DOM1h-131-204	62,3
DOM1h-131-206	64,9
DOM4-130-54	54,1
DOM4-130-201	64,7
DOM4-130-202	64,5

Os dAbs derivado do DOM1h-131-511 foram também comparados em um ensaio à base de células MRC-5 (ver a Tabela 10). Neste ensaio, a capacidade dos dAbs para neutralizar a dispensação de IL-8 estimulada pelo $TNF\alpha$ foi medida para se determinar se o aumento na estabilidade da tripsina tinha levado a uma redução na eficácia. Entretanto, a atividade dos dAbs resistentes à tripsina no ensaio foi substancialmente não afetada.

Tabela 10

Amostra	Nd50 Nm
DOM1h-131-511	1,98
DOM1h-131-511	1,71
DOM 1h-131-511 (230307CE)	1,89
DOM1h-131-203 (230307CE)	2,28
DOM1h-131-204 (230307CE)	1,89
DOM1h-131-511	1,46
DOM1h-131-206 (230307CE)	0,71

Os dAbs derivados do DOM4-130-54 foram testados em um Ensaio de Ligação do Receptor para se verificar se eles ainda tinham a mesma capacidade de inibição da IL-1 à IL-RI (ver a Tabela 11). A atividade dos dAbs resistentes à tripsina não foi afetada neste ensaio.

5 Tabela 11

dAb	IC50 (nM)
DOM4-130-54	280pM
DOM4-130-201	257pM
DOM4-130-202	254pM

EXEMPLO 9

IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE DOM15-26-555

DOM15-26-588, DOM15-26-589, DOM15-26-591 e DOM15-26-593 foram analisados em mais detalhes junto com seu precursor e dois dAbs adicionais, DOM15-26-594 e DOM15-26-595, que foram criados por mutagênese para combinar mutações que deveriam ter o maior impacto sobre a potência e a estabilidade (E6V e F100S/I). As sequências são mostradas na Figura 12. Os clones foram comparados no BIAcore quanto à ligação ao hVEGF na concentração de dAb de 100 nM após incubação com tripsina em uma concentração de 200 µg/ml. A reação foi realizada por três horas e 24 horas em 37 °C com agitação (250 rpm). Os traços do BIAcore do melhor clone, o DOM15-26-593, e do precursor, são mostrados na Figura 13. Outros resultados são apresentados como um diagrama na Figura 14. Os resultados mostram claramente que todas as variantes são mais resistentes do que a precursora à proteólise, após 24 horas de tratamento de tripsina.

A resistência à tripsina do DOM15-26-593 e do precursor foi também examinada pelo desenvolvimento das amostras tratadas e não tratadas em SDS-PAGE. Resumidamente, as proteínas tiveram o tampão trocado por PBS e foram concentradas em 1 mg/ml. 25 µg de proteína foram misturados com 1 µg de tripsina de graduação de sequenciação (Promega) e foram incubados por 0 hora, 1 hora, 3 horas e 24 horas em 30 °C. Após este tempo, a reação foi bloqueada com Inibidor da Protease Completa Roche (1x), e DTT,

assim como o agente de carga, foram adicionados. As amostras foram desnaturadas por cinco minutos em 100 °C. 15 ug de cada amostra foram carregados sobre géis Novex 10-20 % Tricina e as proteínas foram manchadas com SureBlue (1x); Os resultados são apresentados na Figura 15. O perfil de resistência à tripsina do DOM15-26-593 nesta experiência variou do perfil mostrado pela experiência do BIAcore, sugerindo que as diferenças nas condições de reação podem influenciar o resultado final da clivagem da tripsina. Não obstante, o DOM15-26-593 tem melhores propriedades biofísicas, bem como afinidade, do que outros clones selecionados, como mostrado abaixo. Um resumo das propriedades das variantes do DOM15-26-555 é também apresentado na Tabela 12, abaixo.

Tabela 12

dAb	Atributos					
	SEC-MALLS		DSC	RBA	BIAcore	Estabilidade da tripsina
	% em monômero	mw de estabilidade	Temp. °C	nM	KD nM	% em ligação @ + 24 horas
15-26	0	37-136	64	10	28,2	30
15-26-501	0-40	18-290	51	1,14	9,1	5
15-26-555	0	28-78	63	11,7	26,1	10
15-26-588	10	33	70	27	59,1	15
15-26-589	90	17	63	1,94	9,6	65
15-26-591	20	21-234	63	16	38	35
15-26-593	80	17	65	0,323	3,2	80
15-26-595	60	17	65	0,828	5	70

EXEMPLO 10

IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE DOM15-10

DOM15-10-11 foi analisado em mais detalhes, junto com seu precursor, DOM15-10. As sequências são mostradas na Figura 16. Os dAbs foram comparados no BIAcore para ligação ao hVEGF na concentração de dAb de 100 nM após incubação com tripsina em uma concentração de 200 µg/ml. A reação foi realizada por 1 hora, 3 horas e 24 horas em 37 °C com agitação (250 rpm). Os traços de BIAcore destes dAbs são mostrados na

Figura 17. O resultado mostra claramente que a variante selecionada é mais resistente do que a precursora, à proteólise, após 24 horas de tratamento de tripsina.

A resistência à tripsina da diversificação e do precursor foi também examinada pelo desenvolvimento de amostras de SDS-PAGE tratadas e não tratadas. Resumidamente, as proteínas eram tampão trocado para PBS e concentradas a 1 mg/ml. 25 µg de proteína foram misturados com 1 µg de tripsina de graduação de sequenciação (Promega) e incubados por 0 hora, 1 hora, 3 horas e 24 horas, em 30 °C. Após este tempo, a reação foi bloqueada com Inibidor da Protease Completa Roche (1x), e DTT assim como agente de carga foram adicionados. As amostras foram desnaturadas por cinco minutos em 100 °C. 15 µg de cada amostra foram carregados sobre géis de 10 a 20 % de Triceno Novex e as proteínas foram manchadas com SureBlue (1x). Os resultados são apresentados na Figura 18. Neste caso, o perfil resistente à tripsina se correlaciona bem com o teste de BIAcore da tripsina, mostrando que a atividade de ligação reflete diretamente a integridade da proteína.

EXEMPLO 11

OUTRA CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES DE DOM15-26-555 E DOM15-10

Os dAbs foram analisados com o uso da Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) para determinar se o aumento na resistência à tripsina se correlacionava com um aumento na T_m. Os resultados são mostrados na Tabela 13. Há uma correlação entre a resistência à tripsina das variantes de DOM15-26-555 e a temperatura de fusão. O DOM15-26-588 e DOM15-26-593 de diversificação apresentaram T_m melhorada, mas os outros clones não o fizeram. É digno de nota que ambas as moléculas precursoras DOM15-26-555 e DOM15-10 tenham T_m muito mais elevada no início (63,3 a 63,7 °C) do que as moléculas precursoras DOM4-130-54 e DOM1h-131-

511 (T_m no início: 57,9 a 54,1 °C), mas especialmente os clones resistentes à protease alcançam uma T_m em uma faixa semelhante (T_m média de 65,1 °C para as variantes do DOM1h-131-511/DOM4-130-54 e a T_m média de 64,9 °C para as variantes do DOM15-26-55/DOM15-10).

5 Tabela 13

Nome	Temp. °C
DOM15-26-555	63,3
DOM15-26-588	70,1
DOM15-26-589	63
DOM15-26-591	63
DOM15-26-593	65
DOM15-10	63,7
DOM15-10-11	63,3

Os dAbs foram também comparados em um ensaio de ligação do receptor e as cinéticas de BIAcore foram medidas para se determinar se o aumento na estabilidade da tripsina havia levado a um decréscimo na eficácia. Entretanto, a atividade das dAbs no ensaio substancialmente não foi afetada ou mesmo melhorada. Os resultados são apresentados na Tabela 14.

10

Tabela 14

Clone ID	EC ₅₀ (nM)	KD (nM)
DOM15-26-555	11,7	26,1
DOM15-26-588	27	59,1
DOM15-26-589	1,94	9,6
DOM15-26-591	16	38
DOM15-26-593	0,323	3,2
DOM15-26-594	4,09	15,1
DOM15-26-595	0,828	5
DOM15-10	10,23	23,6
DOM15-10-11	3,58	14,6

VANTAGENS DE UMA T_m INTENSIFICADA

A maioria das proteínas – incluindo os anticorpos de domínio – existem em dois estados: um estado duplicado (que leva a uma molécula biologicamente ativa) e um estado não duplicado (que não carrega atividade funcional). Estes dois estados coexistem em todas as temperaturas e a proporção relativa de cada estado é usualmente determinada por uma constante K que é uma função das constantes cinéticas de duplicação e de não

15

duplicação. A temperatura de fusão é usualmente definida como a temperatura em que $K = 1$, isto é, a temperatura em que a fração da proteína duplicada é igual à fração da proteína não duplicada. A constante K é determinada pelas interações intramoleculares de estabilização e inviabilização de uma proteína e, portanto, é principalmente determinada pela sequência de aminoácidos da proteína. Parâmetros extrínsecos tais como a temperatura, o pH, a composição tampão, a influência K da pressão e, portanto, a temperatura de fusão.

As proteínas não duplicadas são alvos fáceis para os mecanismos de degradação: (i) a exposição das ligações dissulfeto aumenta os riscos de oxidação ou redução, dependendo das circunstâncias, (ii) a flexibilidade da estrutura intensificada favorece reações auto-proteolíticas, (iii) a exposição dos segmentos peptídicos oferece alvos para as proteases *in vivo*, a proteases durante os processos de produção e a proteases de propagação durante o processamento de jusante e a armazenagem de longo prazo, e (iv) a exposição dos segmentos propensos à agregação leva à agregação intermolecular e à precipitação protéica. Em todos os casos, uma perda da integridade protéica, do conteúdo protéico e da atividade protéica ocorre, por esse meio comprometendo os esforços para (i) garantir a reprodutibilidade da batelada, (ii) garantir a estabilidade de longo prazo em prateleira, e (iii) eficácia *in vivo*.

Na natureza, as proteínas têm sido designadas pela evolução para adequadamente desempenharem-se na temperatura do corpo, e para serem facilmente substituídas através de mecanismos homeostáticos. As proteínas terapêuticas fabricadas através de processos biotecnológicos enfrentam um ambiente diferente: elas são frequentemente produzidas por tecnologia de DNA recombinante em um hospedeiro estranho, são expressas em quantidade mais elevada em grandes vasos, sofrem mudanças muito importantes no pH ou na composição de tampão completamente nos

processos de jusante e, finalmente, são armazenadas em altas concentrações em tampões não fisiológicos por período de tempo prolongado. Novas técnicas de dispensação (por exemplo inalação, placas subcutâneas, nanopartículas de dispensação lenta) estão também sendo adicionadas sobre o

5 estresse sifrudí oekas oritepubas terapêuticas. Finalmente, o advento das técnicas de engenharia protéica tem resultado na produção de proteínas terapêuticas intensificadas ou totalmente novas. Tendo em vista que a maioria das técnicas de engenharia são técnicas com base *in vitro* que objetivam alterar ou criar novas sequências de aminoácidos, os processos de evolução

10 que têm gradualmente melhorado as proteínas biológicas não ocorrem, daí resultando em proteínas de desempenhos subótimos com respeito à resistência ao estresse.

A técnica da presente invenção objetiva reproduzir uma das condições enfrentadas pela evolução Darwiniana na totalidade das proteínas.

15 Os peptídeos ou polipeptídeos, por exemplo os domínios variáveis únicos de imunoglobulina, são infundidos com proteases que desempenham um papel principal na remodelagem do tecido e na homeostasia protéica. Qualquer mutação particular que possa resultar em uma proteína com um ajuste melhorado à sua função, é também testada quanto à sua capacidade de ajustar-se dentro do ambiente em que ela esteja se desempenhando. Este processo é

20 reproduzido em uma forma de realização da presente invenção: um repertório de variantes peptídicas ou polipeptídicas é criado e exposto a uma protease. Em uma segunda etapa, o repertório de variantes é colocado em contato com um alvo específico. Apenas aquelas variantes protéicas que tenham mantido a

25 degradação pela protease, acham-se capazes de ajustarem-se com o alvo e, portanto, de serem recuperadas, por exemplo mediante um processo simples de purificação da afinidade denominado de 'biobatéria'. O sistema oferece várias vantagens em comparação com os processos *in vivo*: o repertório protéico pode ser enfrentado por uma faixa mais ampla de condições, por

exemplo uma faixa de proteases, em concentrações mais elevadas, por tempos mais longos, em diferentes tampões ou pHs e em diferentes temperaturas. Assim, esta tecnologia *in vitro* oferece um meio para projetar proteínas que possam realizar e permanecer estáveis em uma faixa mais ampla de ambientes do que aqueles dos quais se originaram. Claramente isto oferece vantagens múltiplas para a indústria biotecnológica e para a área de proteínas terapêuticas, em particular.

EXEMPLO 12

10 DADOS DA CORRELAÇÃO PK PARA AS DIVERSIFICAÇÕES RESISTENTES À PROTEASE

O dAb precursor e um dAb resistente à protease em cada uma das quatro linhagens de dAb foram ainda avaliados *in vivo* (ver a Tabela 15 abaixo quanto à lista e detalhes).

Tabela 15

Linhagem	dAb ID	Resistência à tripsina	Temp. (°C)	Atividade (nM)	ID como fusão Fc
DOM4-130	DOM4-130-54	Boa	54	0,128*	DMS1541
	DOM4-130-202	Muito Alta	64	0,160*	DMS1542
DOM1h-131	DOM1h-131-511	Boa	57	0,048†	DMS1543
	DOM1h-131-206	Muito Alta	64	0,047†	DMS1544
DOM15-10	DOM15-10	Baixa	64	0,913†	DMS1546
	DOM15-10-11	Alta	63	0,577†	DMS1531
DOM15-26	DOM15-26-501(*)	Baixa	52	0,330†	DMS1545
	DOM15-26-593	Alta	65	0,033†	DMS1529

*: como determinado pelo bioensaio MRC5/IL-a;

† : como determinado pelo ensaio RBA

Nota: DOM15-26-501 é uma versão precursora do DOM15-26-555 exemplificada acima neste pedido de patente. O DOM15-26-555 tem uma mutação de aminoácidos da linha germinativa em CDR1 (134M). DOM15-26-501 tem uma temperatura de fusão menor do que o DOM15-26-555 (52C v 63,3C) e uma suscetibilidade aumentada à digestão pela tripsina. DOM15-26-501 foi escolhido sobre o DOM15-26-555 para o estudo PK já que ele é um melhor representante para a estabilidade fraca em comparação com o DOM15-26-593.

15 Podemos traduzir a resistência como segue:

1 é baixa

2 é moderada

3 é boa

4 é alta

5 é muito alta

Então isto significa que a resistência à tripsina das moléculas

5 precursoras é:

DOM4-130-54 é Boa

DOM1h-131-511 é Boa

DOM15-10 é Baixa

DOM15-26-501 é Baixa

10 No que diz respeito às diversificações selecionadas:

DOM4-130-202 é Muito alta

DOM1h-131-206 é Muito alta

DOM15-10-11 é Alta

DOM15-26-593 é Alta

15 Tendo em vista que os anticorpos de domínio são pequenos no tamanho (12 a 15 kDa), eles são rapidamente depurados da circulação após injeção iv ou sc. De fato, o corte da filtração glomerular renal situa-se acima de 50 kDa e, portanto, pequenas proteínas tais como as dAbs não ficam retidas na circulação quando elas passam através dos rins. Portanto, de modo

20 a avaliar os efeitos de longo prazo da resistência às proteases *in vivo*, nós rotulamos os anticorpos de domínio com um componente que aumenta a permanência sistêmica. Várias abordagens (por exemplo PEG, fusões de Fc, fusão de albumina, etc.) objetivando meia-vida prolongada, têm sido relatadas na literatura. Neste pedido, os anticorpos de domínio foram rotulados (ou

25 formatados) com a porção Fc do anticorpo de IgG1 humano. Este formado oferece duas vantagens: (i) o tamanho molecular do dAb-Fc resultante é de ~75 kDa, o qual é grande o bastante para garantir a retenção na circulação, (ii) o componente de Fc de anticorpo se liga ao receptor FcRn (também conhecido como receptor de “Brambell”). Este receptor fica localizado nas

células epiteliais, nas células endoteliais e nos hepatócitos, e se acha envolvido em prolongar a extensão de vida dos anticorpos e da albumina: de fato, após a pinocitose dos anticorpos e outras proteínas séricas, as proteínas são dirigidas ao endossomo acidificado onde o receptor FcRn intercepta anticorpos (através da ligação à porção Fc) antes da passagem para o endossomo e retorna-os à circulação. Assim, pela rotulagem da porção de Fc para o dAb, é garantido que os dAbs serão expostos por longo período a pelo menos dois compartimentos – o soro e os compartimentos pré-endossômicos, cada um dos quais contendo um conjunto específico de enzimas proteolíticas. Além disso, o receptor FcRn medeia a transcitose por meio do que a proteínas carregando Fc migram para, e do, espaço extravascular.

A formatação com Fc foi realizada pela fusão do gene codificando os dAbs V_H e V_K ao gene codificando o Fc de IgG1 humano, através de um ligador peptídico interveniente curto (em negrito):

Para um dAb V_H (sublinhado):
 EVQ.....GQGTLVTVSSASTHTCPPCPAPPELLGGP...(hlgG1Fc)...PGK*

Para um dAb V_K (sublinhado)
 DIQ.....GQGTKVEIKRTVAAPSTHTCPPCPAPPELLGGP...(hlgG1Fc)...PGK*

O material foi produzido por transfecção transiente das células HEK293/6E com o uso de 293-fectina (Invitrogen) de acordo com os protocolos padrão. Estas células são projetadas para expressão transiente de alto nível quando usadas em combinação com a série pTT de vetores (Durocher *et al.* 202). Assim, os genes de dAb foram clonados em um vetor pTT5 modificado (pDOM38) para gerar o vetor de expressão da fusão Fc (ver Figura 21). O sobrenadante das células transfectadas foi colhido em 5 dias após a transfecção, clarificado por centrifugação e filtrado através de um filtro de 0,2 μ m. As proteínas de fusão dAb-Fc foram purificadas pela captura na resina da linha de circulação livre da Proteína A (GE Helthcare). A proteína foi eluída da coluna em citrato de sódio 10 mM, pH 3, seguido pela adição de

citrato de sódio 1 M, pH 6, para se obter uma composição final de citrato de sódio 100 mM, pH 6.

As moléculas de dAb-Fc foram testadas quanto à meia-vida *in vivo* no rato em uma dose alvo de 5 mg/kg em ratos Sprague-Dawley fêmeas (n = 3 por grupo). Deve-se observar que a dose alvo excede amplamente a concentração alvo nos ratos, de modo que se espera que as diferenças na afinidade entre os dAbs precursores e os dAbs resistentes à tripsina (ver Exemplo 11) não causem impacto sobre o destino das moléculas *in vivo*. Consequentemente, diferenças nos perfis de PK entre os dAbs são esperadas refletirem-se em um processo de eliminação independentemente de antígeno.

Amostras de sangue foram colhidas após 0,03, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas após a administração. Após a formação do coágulo, soro foi retirado e depois testado em ensaios de captura de antígenos de hIL-1R1, TNFR1 ou VEGF:

- 15 Ensaios de Captura do Antígeno hIL-1R1:
 Revestir com 4 ug/ml de anti-hIL-1R1
 Bloquear
 Adicionar 500 ng/ml de shIL-1R1
 Adicionar amostras
- 20 Detectar com FcHRP anti-humano a 1:10.000
 Ensaios de Captura do Antígeno de TNFR1:
 Revestir com 0,1 ug/ml de sTNFR1
 Bloquear
 Adicionar amostras
- 25 Detectar com FcHRP anti-humano a 1:10.000
 Ensaios de Captura do Antígeno de VEGF:
 Revestir com 0,25 ug/ml de VEGF
 Bloquear
 Adicionar 500 ng/ml de shIL-1R1

Adicionar amostras

Detectar com Fc HRP anti-humano a 1:10.000

Os dados brutos dos ensaios foram transformados nas concentrações do medicamento em cada amostra de soro. Os valores médios $\mu\text{g/ml}$ em cada ponto do tempo foram então analisados em WinNonLin com o uso de análise não compartimental (NCA). Os perfis de PK de cada par de dAb-Fc são mostrados na Tabela 16, a qual resume os parâmetros de PK determinados.

Tabela 16

ID	dAb	Vida média (h)	AUC/D (0-inf) (hr* $\mu\text{g/mL}$)/(mg/kg)	% em AUC extrapolado
DMS1541	4-130-54	93,2	691,5	22,7
DMS1542	4-130-202	176,8	710,1	49
DMS1543	lh-131-511	140,8	1807,5	40
DMS1544	lh-131-206	158,6	2173,0	43,6
DMS1546	15-10	43,2	324,6	3,8
DMS1531	15-10-11	56,6	770,5	n,d,
DMS1545	15-26-501	12,9	89	5,1
DMS1529	15-26-593	86,2	804,7	21,0

Os resultados claramente indicam que – embora os perfis de PK dos pares de dAb-Fc 4-130-54 a 1h-131-206 sejam quase sobreponíveis – os perfis variam amplamente com os outros pares. Os efeitos são na maioria das vezes visíveis quando AUC/D é considerada: a AUC/D de 15-10 é apenas de 42 % daquele da 15-10-11. A AUC/D da 15-26-501 é de apenas 11 % daquele da 15-26-593. Estas diferenças importantes também causam impacto (em uma menor extensão) às meias-vidas: 43,2 horas contra 56,6 horas para 15-10 e 15-10-11, respectivamente. Uma maior diferença é observada com a linhagem de DOM15-26: 12,9 horas contra 86,2 horas para 15-26-501 e 15-26-593, respectivamente. De fato, para uma boa análise de PK com o uso da análise não compartimental, deve haver pelo menos 4 pontos de dados usados para ajustar a inclinação da regressão linear, e o período de tempo através do qual a meia-vida é estimada deve ser de pelo menos 3 vezes aquele da meia-vida calculada.

À luz das propriedades biofísicas descritas nos presentes exemplos, parece que a capacidade de qualquer dAb dado para resistir à degradação pela tripsina correlaciona-se com a capacidade da fusão de dAb-Fc para circular por período mais longo no soro de ratos. De fato, como
5 mostrado nos exemplos, tais como o Exemplo 10, DOM15-10 e DOM15-26-501 são os dAbs mais degradáveis: a incubação de 25 ug de dAb na presença de 1 ug de tripsina em 30 °C por ~3 horas, resultou em completa degradação. Todos os outros dAbs neste estudo [quer eles tenham sido selecionados com tripsina (isto é, DOM15-10-11, DOM15-26-593, DOM4-130-202 e DOM1h-
10 131-206) ou quer eles já tivessem alguma resistência à tripsina como moléculas precursoras (DOM4-130-54 e DOM1h-131-511)] têm perfil de PK comparáveis em ratos quando reformatados nas moléculas de dAb-Fc. Assim, o presente estudo de PK sugere que a suscetibilidade à proteólise tenha seu maior impacto sobre a estabilidade *in vivo* dos dAbs quando aqueles dAbs
15 tenham resistência muito baixa à proteólise. Ele também mostra que – além de um certo nível – outros incrementos na resistência à degradação pela tripsina (por exemplo, DOM4-130-206 e DOM4-130-54) não acrescentam significativamente até a capacidade da molécula de dAb-Fc para ainda reduzir a eliminação *in vivo*.

20 Em três casos, a seleção na presença de tripsina resultou em novas moléculas com estabilidade térmica aumentada (definida pela temperatura de fusão): DOM4-130-202, DOM1h-131-206 e DOM15-26-593. O estudo de PK indica que – no presente grupo de dados - a temperatura de fusão não é um parâmetro adequado para racionalizar os perfis de PK
25 observados: de fato, o DOM15-10 tem uma T_m mais elevada do que o DOM15-10-11 e ainda é mais rapidamente depurado do que o DOM15-10-11 da circulação. Além disso, os dois dAbs da linhagem de DOM4-130 têm marcadamente diferente T_m (em 10 °C) e apresentam ainda estabilidade quase idêntica *in vivo* quando formatados nas moléculas de dAb-Fc. Deve-se

observar que a temperatura de fusão não é por si excluída como parâmetro chave para prever a estabilidade *in vivo*. Acontece de fato que, com o presente conjunto de dados, grandes diferenças de T_m (de 54 °C e acima) não tenham um impacto significativo sobre o destino dos dAbs *in vivo*. Isto não exclui a possibilidade de que nas temperaturas de fusão menores do que 54 °C, a estabilidade *in vivo* dos dAbs possam correlacionar-se com a estabilidade térmica, ou talvez mesmo com a estabilidade térmica e a resistência às proteases conjuntamente.

EXEMPLO 13

SELEÇÕES DA TRIPSINA NO DOM10-53-474

Estabilidade da tripsina do DOM10-53-474:

DOM10-53-474 é um anticorpo de domínio que se liga a IL-13 com uma alta potência. Para avaliar a estabilidade deste dAb na presença de tripsina, dAb purificado foi digerido com tripsina por pontos do tempo aumentados e desenvolvimento sobre um gel para examinar qualquer possível degradação da proteína. 25 µl de DOM10-53-474 purificado em 1 mg/ml foram incubados com 1 µl de tripsina de graduação de sequenciação em 1 mg/ml a 30 °C, resultando na relação molecular de dAb:tripsina de 25:1. O dAb foi incubado com tripsina por 1 hora, 4 horas e 24 horas e a atividade da protease foi neutralizada pela adição de 4 µl de inibidores da protease completa Roche seguida por incubação sobre gelo. A amostra de tempo 0 foi produzida pela adição de inibidores da protease ao dAb sem adicionar-se tripsina. 2 µl da amostra foram subsequentemente analisados por eletroforese com o uso de Labchip de acordo com instruções dos fabricantes.

A Figura 22 mostra um desenvolvimento em gel com DOM10-53-474 incubado com tripsina por pontos do tempo aumentados. Para comparação, um dos dAbs estáveis em tripsina, o DOM15-26-593, foi também tratado com tripsina como explanado acima, e foi desenvolvido lado a lado. Como mostrado na figura, o DOM15-26-593 parece estável mesmo

após 24 horas de incubação com tripsina. Entretanto, o DOM10-53-474 é degradado até uma certa extensão após 24 horas, mas parecendo estável nos pontos do tempo de 1 hora e 4 horas. Estes dados sugerem que o DOM10-53-474 é resistente à degradação pela tripsina até uma certa extensão, mas não é tão estável como um dos dAbs mais estáveis à tripsina, o DOM15-26-593.

Estabilidade à tripsina do DOM10-53-474 apresentado pelo fago:

Para avaliar a estabilidade à tripsina do DOM10-53-474 apresentado pelo fago, o gene codificando o DOM10-53-474 foi clonado nos sítios *Sal/Not* do pDOM33 (Figura 50) e o fago foi produzido de acordo com técnicas padrão. O fago foi purificado por precipitação de PEG, recolocado em suspensão em PBS e titulado.

Os dAbs apresentados pelo fato foram incubados com tripsina por diferentes pontos do tempo para avaliar a resistência à tripsina. Em seguida à incubação com tripsina, a estabilidade foi medida pela análise do título em seguida à infecção das células TG1 de *E. coli* exponencialmente crescentes.

100 µl de fago foram incubados em 100 µg/ml de tripsina por 1 hora, 2 horas, 4 horas e durante a noite em 37 °C, em uma incubadora vibratória. A atividade da tripsina foi bloqueada com o inibidor da protease completa Roche (x2) e depois o fago foi diluído em 2 % de *marvel* em PBS, incubado com IL-13 10 nM biotinilado por uma hora na temperatura ambiente. Contas revestidas de estreptavidina (Dynabeads M-280 (Invitrogen), que foram pré-bloqueadas por uma hora na temperatura ambiente com 2 % de *marvel* em PBS, foram adicionadas, e a mistura foi então incubada por 5 minutos na temperatura ambiente. Todas as etapas da incubação com Dynabeads foram realizadas em uma roda giratória. O fago não ligado foi retirado por lavagem das contas por oito vezes com 1 ml de Tween-20 a 0,1 % em PBS. O fago ligado foi eluído com 0,5 ml de Glicina

0,1 M, pH 2,2, e neutralizado com 100 µl de Tris 1 M-HCl, pH 8,0. O fago eluído foi usado para infeccionar TG1 exponencialmente crescente (1 hora em 37 °C) e foi plaqueado sobre placas de tetraciclina. As placas foram incubadas em 37 °C durante a noite e as contagens das colônias foram feitas. Os títulos de desenvolvimento dos fagos em seguida à digestão com tripsina, são resumidos na Tabela 17. Os títulos dos fagos foram reduzidos quando incubados com tripsina por pontos do tempo aumentados. Após 24 horas de incubação, todos os fagos foram digeridos.

Tabela 17: Títulos de Desenvolvimento das Seleções de Tripsina Realizadas nos Precursores de DOM-10-53-474 Apresentados no Fago

Comprimento da incubação da tripsina	Concentração de tripsina	Titulador
Nenhum controle de tripsina	-	3 x 10 ⁷
1h	100 µg/ml	1 x 10
2h	100 µg/ml	7 x 10 ⁶
4h	100 µg/ml	5 x 10 ⁶
durante a noite	100 µg/ml	0

Seleção dos dAbs mais resistentes à tripsina:

De modo a selecionar os dAbs que são mais resistentes à degradação pela tripsina, mutações aleatórias foram introduzidas ao gene codificando DOM10-53-474 por PCR com o uso do kit Mutazyme 11 da Stratagene, iniciadores biotinilados e 5 a 50 pg de gabarito para 50 µl da reação. Após a digestão com *Sal1* e *Not1*, os insertos foram purificados dos produtos não digeridos com contas revestidas de estreptavidina e ligados no pDOM33 nos sítios correspondentes. Células de TB1 de *E. coli* foram transformadas com mistura de ligação purificada, resultando em uma biblioteca propensa a erro do DOM10-53-474. O tamanho da biblioteca foi de 1,9 x 10⁹ e a taxa de mutação do aminoácido foi de 1,3.

Três séries de seleções foram realizadas com esta biblioteca para selecionar dAbs com resistência melhorada à protease. A primeira série da seleção foi realizada apenas com antígeno sem tratamento de tripsina para limpar a biblioteca para remover quaisquer clones que não mais se ligavam a

antígeno com alta afinidade. A seleção foi realizada em IL-13 10 nM. Os rendimentos da série um foram de 2×10^9 em comparação com o fago de entrada de 6×10^{10} , indicando que a maioria da biblioteca se ligava a antígeno com alta afinidade.

5 As segunda e terceira séries de seleções foram realizadas com IL-13 biotinilada 1 nM. Antes do uso de batéia sobre IL-13, o fago foi incubado com 100 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina em 37 °C em uma batadeira (250 rpm). Quanto à seleção da segunda série, a incubação da tripsina foi realizada por 1 hora, ou na temperatura ambiente ou em 37 °C. As saídas da seleção da série 10 2 são mostradas na Tabela 18:

Tabela 18: Títulos dos fagos de saída em seguida à seleção da segunda série.

Tratamento de tripsina	Titulador
Nenhum tratamento	1×10^8
1 hora em temperatura ambiente	5×10^7
1 h 37°C	2×10^7

As saídas dos fagos da seleção da série 2 com o tratamento da tripsina de 1 hora em 37 °C, foram usadas como a entrada para a seleção da 3ª série. Para a seleção da 3ª série, o fago foi tratado com 100 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina, 15 porém por pontos do tempo mais longos: 2 horas em 37 °C, 4 horas em 37 °C, durante a noite na temperatura ambiente ou durante a noite em 37 °C. Os títulos das saídas para a seleção da 3ª série são resumidos na Tabela 19.

Tabela 19: Títulos dos fagos de saída em seguida à seleção da terceira série

Tratamento de tripsina	Titulador
Nenhuma tripsina	$1,3 \times 10^8$
2h at 37°C	$1,9 \times 10^7$
4h at 37°C	2×10^6
durante a noite em temperatura ambiente	4×10^7
durante a noite a 37 °C	$2,1 \times 10^6$

Vários clones de cada saída de seleção das séries 1, 2 e 3 20 foram sequenciados para se avaliar a diversidade de sequências. Em seguida à primeira série da seleção sem tratamento de tripsina, 50 % das saídas da seleção tiveram sequência de DOM10-53-474 precursora. Após a 2ª série da seleção, o percentual da precursora aumentou para 75 %. Após a 3ª série da

seleção, o percentual da precursora aumentou para 80 %.

Estes dados indicam que DOM10-53-474 já se mostrou resistente à degradação pela tripsina e muitos novos clones não podem ser selecionados destas seleções de tripsina. A Figura 22 mostra que, quando a proteína purificada foi digerida com tripsina, DOM10-53-474 não foi completamente digerida mesmo após o tratamento de tripsina durante a noite. Entretanto, para ver se existem quaisquer novos clones que sejam mais resistentes à tripsina do que DOM10-53-474 nas saídas das seleções, a saída da seleção 3 em que o fago foi tratado durante a noite com tripsina em 37 °C foi subclonada em pDOM5. Centenas de clones foram então sequenciados para procurar quaisquer clones resistentes à tripsina. Dos cem clones analisados, apenas 26 clones tiveram novas sequências, porém nenhum destes clones tiveram mutações nos sítios de clivagem da tripsina (Lisina ou Arginina), sugerindo que estes clones não eram mais resistentes à tripsina do que o DOM-10-53-474.

EXEMPLO 14

Armazenagem e Melhoramentos Biofísicos Introduzidos nos dAbs de DOM0101 de Diversificação (anti-TNFR1) por Seleções de Fago na Presença de Tripsina:

Para melhorar a resistência à protease da molécula de diversificação DOM1h-131-511, as seleções de fagos na presença de tripsina foram realizadas como descritas anteriormente. O método produziu uma faixa de clones com estabilidade da tripsina melhorada em comparação com a molécula precursora DOM1h-131-511. Dois clones, DOM1h-131-202 e DOM1h-131-206, foram selecionados para outra caracterização, já que eles apresentavam o melhoramento mais significativo à ação da tripsina. Outro trabalho, como delineado abaixo, mostra que, com a resistência melhorada à ação da tripsina, existem outros efeitos benéficos, principalmente sobre a estabilidade das moléculas ao cisalhamento e ao estresse térmico. Estes dois

parâmetros são fundamentais para aumentar a estabilidade em armazenagem e na vida de prateleira dos produtos biofarmacêuticos.

Produção dos dAbs do DOM0101 de diversificação em *Pichia pastoris*:

5 Os genes codificando a sequência de aminoácidos primária das três moléculas de diversificação, foram usados para produzir a proteína secretada em *Pichia pastoris*. Os três genes sintéticos (DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 e DOM1h-131-206) foram clonados no vetor de expressão pPIC-Z α e depois transformados nas duas cepas de *Pichia*, X33 e KM71H.
10 As células transformadas foram plaqueadas em concentrações crescentes de Zeocina (100, 300, 600 e 900 $\mu\text{g/ml}$) para selecionar clones com múltiplos integrantes. Vários clones foram então testados em frascos de 2 litros para identificar as linhagens celulares de alta expressão. Os melhores clones de expressão foram então usados para produzir material na escala de 5 litros em
15 fermentadores.

Purificação de proteínas e caracterização do material:

De modo a produzir material de alta qualidade para caracterização e outros estudos de estabilidade, um processo de purificação de jusante foi planejado com o uso de uma resina de indução de carga modal
20 mista (Capto MMC) como a etapa de captura primária, seguido pela troca de ânions (Q Sepharose). Sem otimização significativa, isto permitiu a recuperação de ~70 % do dAb expresso em uma pureza de ~95 %. O material foi caracterizado quanto à identidade com o uso de espectrometria de massa de eletropulverização, sequenciação de terminal amino e focalização
25 isoeétrica, e quanto à pureza com o uso de SDS-PAGE e SEC (cromatografia de exclusão de tamanho).

Identidade protéica:

A análise da sequência de terminal amino dos primeiros cinco resíduos de cada proteína foi como esperado (EVQLL...). A espectrometris de

massa foi realizada sobre amostras das proteínas que haviam sido trocadas em tampão em H₂O:acetonitrila 50:50 contendo 0,1 % de ácido acético glacial com o uso de Zip-tips C4 (Millipore). A massa medida para cada uma das três proteínas situou-se dentro de 0,5 Da da massa teórica com base na sequência primária de aminoácidos (calculada com o uso de massas médias) quando levando-se em conta uma diferença de massa de -2 da formação da ligação dissulfeto interna. IEF foi usado para identificar as proteínas com base em seu pI, o qual foi diferente para cada proteína.

Pureza Protéica:

10 As três proteínas foram carregadas sobre géis de SDS-PAGE não redutores nas quantidades de 1 µg e 10 µg em duplicada. Uma faixa única foi observada em todos os casos.

A cromatografia de exclusão de tamanho foi também realizada para demonstrar os níveis de pureza. Para a cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), 100 µg de cada proteína foram carregados em uma coluna TOSOH G2000 SWXL fluindo em 0,5 ml/minuto. A fase móvel foi de PBS/10 % de etanol. O percentual de monômero foi medido com base na área sob a curva (ver a Figura 23).

Comparação da estabilidade dos DOM1h-131-511, -202 e -206

20 Avaliação da estabilidade da protease:

A estabilidade da protease dos DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 e DOM1h-131-206 foi avaliada por análise de BIAcore[®] da atividade de ligação residual após a pré-incubação por pontos do tempo definidos nos excedentes das proteases. Aproximadamente 1400 RU de TNFR1 biotinizado foram aplicados a um fragmento de estreptavidina (SA). 250 nM de DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 e DOM1h-131-206 foram incubados com apenas PBS ou com 100 µg/ml de tripsina, elastase ou leucosima por 1, 3 e 24 horas em 30 °C. A reação foi interrompida pela adição de um coquetel de inibidores da protease. As misturas de dAb/protease foram então passadas através do

fragmento revestido de TNFR1 com o uso de subtração de células de referência. A superfície do fragmento foi regenerada com 10 μ l de glicina 0,1 M, pH 2,2, entre cada ciclo de injeção. A fração de DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 e DOM1h-131-206 ligada ao TNFR1 humano (em 10 segundos) pré-incubado com proteases, foi determinada em relação à ligação do dAb sem proteases. Os desenvolvimentos de BIAcore[®] foram realizados em 25 °C. Os dados abaixo foram produzidos de três experiências independentes. O gráfico de barras indica valores médios e as barras de erro indicam o desvio padrão dos resultados (Figura 24).

Foi observado que os DOM1h-131-202 e DOM1h-131-206 foram apresentados como tendo maior resistência à degradação proteolítica pela tripsina, elastase ou leucosima, em comparação com o DOM1h-131-511. A diferença entre o DOM1h-131-202 e o DOM1h-131-206 na comparação com o DOM1h-131-511 é mais pronunciada após 1 hora com tripsina e após 3 horas com elastase ou leucosima. Existe uma tendência de que o DOM1h-131-206 é levemente mais estável em comparação com o DOM1h-131-202 na maior parte das condições testadas.

Estabilidade térmica dos dAbs determinada com o uso de DSC:

De modo a determinar em que pH as moléculas de diversificação tinham a maior estabilidade, o calorímetro de varredura diferencial (DSC) foi usado para medir as temperaturas de fusão (T_m) de cada dAb no tampão de Britton-Robinson. Como o Britton-Robinson é composto de três sistemas de tampão componente (40 mM de cada dentre os ácidos acético, fosfórico e bórico), é possível produzir uma faixa de pH de 3 a 10 na mesma solução. O pI teórico foi determinado da sequência de aminoácidos primária de proteínas. Do DSC, o pH em que os dAbs tiveram sua estabilidade térmica intrínseca mais elevada foi encontrado como sendo o pH 7 para o DOM1h-131-202, o pH 7 a 7,5 para o DOM1h-131-206 e o pH 7,5

para o DOM1h-131-511. Para todo o trabalho subsequente de estresse e de estabilidade, os seguintes pHs foram usados para cada dAb; para DOM1h-131-202 e GSK1995057A DOM1h-131-206 pH 7,0 e para DOM1h-131-511, pH 7,5 no tampão de Britton-Robinson. Os resultados são resumidos na Tabela 20.

Tabela 20: Resumo do pH e das T_m s dos DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 e DOM1h-131-511 determinado por DSC no tampão de Britton-Robinson em 1 mg/ml. A temperatura foi fixada em 180 °C/hora.

DAb	pH que dá maior estabilidade térmica intrínseca	T_m (°C) do dAb no dado pH
DOM1h-131-202	7,0	68,6
DOM1h-131-206	7,0-7,5	65,8
DOM1h-131-511	7,5	58,0

Teste de estabilidade térmica de duas semanas

A capacidade de uma proteína de resistir a períodos prolongados de tempo em temperaturas elevadas é usualmente uma boa indicação de sua estabilidade. Sob estas condições, a proteína pode ser submetida a vários processos físicos, tais como a agregação ou a modificação química. Os dAbs (em 1 mg/ml) foram incubados em 37 e 50 °C por 14 dias em tampão de Britton-Robinson. A SEC foi usada para determinar quanto monômero foi deixado em solução através do período de 14 dias (Figura 25).

Da Figura 25, pode-se observar que tanto o DOM1h-131-202 quanto o DOM1h-131-206 são significativamente mais estáveis do que o DOM1h-131-511 ao estresse térmico. A exposição das proteínas a temperaturas elevadas, tais como 37 e 50 °C, é rotineiramente usada para dar uma indicação sobre a vida de prateleira de longo prazo dos medicamentos. Estas temperaturas mais elevadas são usadas para acelerar o processo normal associado com a armazenagem de longo prazo na temperatura ambiente, tal como a desamidação, a oxidação ou a agregação. O nível de formação da agregação na solução pode também ser monitorado com o uso do SEC (Figuras 26A a I). Após 14 dias em 37 °C, a perda de DOM1h-131-511 da

solução pode ser atribuída tanto à precipitação quanto à formação de agregados de ordenação mais elevada, como determinado pela SEC (Figura 26B). Uma perda significativamente menor na proteína é também observada tanto com o DOM1h-131-202 quanto com o DOM1h-131-206 em 37 °C após 5 14 dias com muito pouco ou sem aumento substancial na formação dos agregados, especialmente no caso do DOM1h-131-206 (Figura 26H). Em 50 °C, a diferença entre as moléculas é ainda mais pronunciada, com o DOM1h-131-206 apresentando estabilidade melhor na temperatura mais elevada, do que o DOM1h-131-202, após 14 dias, apresentando formação 10 significativamente reduzida dos agregados de peso molecular mais elevado (Figura 26). Com relação à $t = 0$, o DOM1h-131-206 apresenta apenas um pequeno aumento na formação dos agregados após 14 dias (Figura 26I), enquanto o DOM1h-131-511 quase se precipitou fora da solução (Figura 26C).

15 Isto mostra que as mudanças introduzidas no dAb pelas seleções da tripsina, por exemplo a estabilidade térmica melhorada, melhorou significativamente a estabilidade em armazenagem da proteína em 37 e 50 °C. Tanto o DOM1h-131-202 quanto, mais significativamente, o DOM1h-131-206, claramente têm estabilidade da solução melhorada e menor tendência a 20 formar agregados nas temperaturas elevadas, o que pode diretamente ser traduzido para estabilidade melhorada de armazenagem de longo prazo em temperaturas mais relevantes, tais como +4 °C e temperatura ambiente.

25 As amostras de pontos do tempo de 2 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias da experiência de estresse térmico foram então analisadas por IEF para se observar se as proteínas haviam sofrido quaisquer mudanças biofísicas que pudessem afetar a carga global da proteína (Figura 27).

Novamente, tanto o DOM1h-131-202 quanto o DOM1h-131-206 não apresentam quaisquer mudanças significativas em 37 °C em comparação com o DOM1h-131-511. Com o DOM1h-131-511, uma segunda

faixa débil aparece em 37 °C após 24 horas. Acredita-se que esta faixa extraordinária seja devida à dimerização da proteína, assim mascarando a carga e produzindo duas populações de moléculas. Nos 50 °C, a diferença entre as moléculas é mais pronunciada, o DOM1h-131-206 nitidamente não apresenta quaisquer mudanças significativas na temperatura elevada, ao passo que o DOM1h-131-202 se acha mostrando algum sinal de modificação após 24 horas. A maioria do DOM1h-131-511 é perdida pela precipitação após 48 horas em Britton-Robinson.

A $T = 0,7$ e o ponto do tempo de 14 dias em 50 °C, foram analisados pelo RBA de TNFR-1 para determinar a funcionalidade da proteína após a exposição a altas temperaturas (Figura 28). O ensaio não é presentemente tão sensível quanto SEC ou IEF em detectar mudanças sutis à molécula devidas ao estresse, mas podem ser usados para mostrar que o dAb ainda pode ligar-se ao antígeno.

A mudança na curva para a esquerda quanto ao DOM1h-131-511 reflete o fato de que a maioria do dAb tenha sido perdida por causa da precipitação. O material que é deixado em solução é ainda capaz de ligar-se ao antígeno. Como mostrado na Figura 25, a maioria tanto do DOM1h-131-202 quanto do DOM1h-131-206 é capaz de ser mantida em solução mesmo após os 14 dias. O RBA mostra que toda a proteína solúvel é ainda funcional e capaz de ligar-se ao TNFR1.

Teste de estabilidade em armazenagem em contrações elevadas de proteínas

Experiências foram realizadas para pesquisar a estabilidade em armazenagem em +4 °C em concentrações protéicas muito elevadas, para se observar como cada molécula se desempenhou sob estas condições. Todos os dAbs de diversificação foram concentrados em concentradores centrífugos Vivaspin (corte de 5K) em tampão de Britton-Robinson em seu pH mais estável, até ~100 mg/ml. As amostras em ~100 mg/ml foram então deixadas

em +4 °C por 7 dias e depois analisadas por SEC para se observar se quaisquer outras mudanças físicas haviam ocorrido nas amostras durante a armazenagem em altas concentrações (Figura 29). As amostras foram diluídas a ~1 mg/ml antes de serem desenvolvidas na coluna de SEC em 1xPBS 10 % de etanol (v/v).

Dos traços da SEC pode-se observar que nem o DOM1h-131-202 nem o DOM1h-131-206 apresentam qualquer aumento significativo na formação dos agregados após 7 dias, enquanto existe redução de ~2 % na concentração monomérica para o DOM1h-131-511.

Dispensação do nebulizador dos dAbs de diversificação:

Quanto ao estágio prematuro da toxicologia e ao trabalho clínico, os dAbs serão formulados como um líquido e liberados através de um dispositivo nebulizador. Dependendo do dispositivo (por exemplo ultrassônico, jato ou malha vibratória), o dAb experimentou um grau de cisalhamento e estresse térmico quando ele foi nebulizado para formar um aerossol de tamanho de partículas definido. Como tanto o DOM1h-131-202 quanto o DOM1h-131-206 têm T_m 's mais elevadas e apresentaram estabilidade consideravelmente melhorada ao estresse térmico em comparação com o DOM1h-131-511, todos os dAbs foram testados em dois dispositivos nebulizadores para se observar como eles responderiam ao cisalhamento/estresse térmico induzido durante a nebulização. Tanto a proteína do aerossol nebulizado quanto o dAb remanescente no dispositivo (isto é, na cuba) foram então analisados por sEC para se determinar a quantidade de agregação gerada durante o processo.

Todas as moléculas foram testadas em tampão de Britton-Robinson em seu pH mais estável. Os dAbs foram testados tanto no E-flow Rapid (malha vibratória) quanto no Pari LC+ (nebulizador a jato) com o tempo de desenvolvimento de 3,5 minutos em uma concentração de proteína de 5 mg/ml e a distribuição de tamanho de partículas determinada com o uso

de um Malvern Spraytek. Os resultados são mostrados na Figura 30. Para a boa dispensação e distribuição no pulmão inferior, o tamanho de partícula ideal é $< 5 \mu\text{m}$. Todos os dAbs forneceram níveis comparáveis de tamanhos de partículas que eram menores do que $5 \mu\text{m}$ no tampão de Britton-Robinson.

5 A concentração do dAb na cuba do dispositivo foi determinada pelas medições de A_{280} antes e após a nebulização (dados não mostrados). Foi observado que a concentração protéica não mudou significativamente, indicando que nem a proteína nem o veículo devem ser preferivelmente nebulizados durante a dispensação.

10 As amostras dos dAbs nebulizados no tampão de Britton-Robinson foram desenvolvidas em SEC para se determinar se, durante a dispensação, a proteína havia sofrido quaisquer mudanças físicas. A Figura 31 mostra o percentual relativo da mudança ou na cuba ou no aerossol como determinado por SEC. Pode-se observar que tanto o DOM1h-131-202 quanto
15 o DOM1h-131-206 sofrem pequenas mudanças relativas na concentração do monômero em relação ao DOM1h-131-511. Isto demonstra que tanto DOM1h-131-202 quanto DOM1h-131-206 com suas T_m 's melhoradas têm menos propensão de agregar-se durante a nebulização.

A Figura 32 mostra os traços reais de SEC para o DOM1h-
20 131-206 e o DOM1h-131-511 no tampão de Britton-Robinson após a nebulização, e demonstra que a perda relativa no monômero (Figura 31) é devida à formação de dímeros. Isto novamente fornece outra evidência de apoio à teoria de que a maior estabilidade térmica mostrada pelos DOM1h-131-202 e DOM1h-131-206 pode prevenir a agregação significativa, mesmo
25 em um tampão de formulação não otimizada.

Quanto à toxicologia e ao trabalho de avaliação da segurança, é necessário liberar o dAb em níveis significativamente mais elevados no animal do que as doses terapêuticas dadas aos pacientes. Isto pode apenas ser obtido pelo uso de concentrações protéicas significativamente mais elevadas,

e/ou dispensação do dAb através de um período de tempo prolongado. Como já havia sido demonstrado que o DOM1h-131-511 forma agregados na nebulização em 5 mg/ml durante 3,5 minutos, o DOM1h-131-206 foi testado em 40 mg/ml em PBS e nebulizado com o uso do Pari LC+ por até 1 hora. As amostras do cuba e do aerossol foram tomadas nos pontos do tempo até desenvolvimento total, para se observar se a nebulização prolongada faria com que os dAbs se agregassem por causa do cisalhamento ou do estresse térmico determinado por SEC e a concentração protéica (medições A280 nm). A Tabela 21 mostra a concentração protéica do dAb tanto na cuba quanto no aerossol, como determinado por A280.

Tabela 21: Concentração protéica medida do DOM1h-131-206 como determinado pelas leituras da absorbância de A280 tanto para a cuba quanto para o aerossol durante a nebulização do dAb em ~40 mg/ml com o uso do Pari LC+. Levando-se em conta os erros da diluição e o erro instrumental, a concentração das amostras não mudaram após a nebulização do dAb durante 1 hora.

Tempo (minutos)	Amostra do copo (mg/ml)	Amostra do aerossol (mg/ml)
1	43.8	43.4
29	44.5	43.5
59	44.6	44.1

Da Tabela 21, pode-se observar que a concentração da proteína não mudou significativamente durante o desenvolvimento, demonstrando que não houve nenhuma perda significativa da proteína devida à agregação. A Figura 33 mostra que, durante o período de 1 hora de nebulização, o DOM1h-131-206 não forma quaisquer agregados ordenados mais elevados, tais como dímeros, como determinado por SEC. Isto claramente demonstra que as propriedades biofísicas melhoradas, como introduzidas na molécula pelas seleções de tripsina, aumenta significativamente a resistência dos dAbs ao cisalhamento e ao estresse térmico, e que isto pode ser diretamente correlacionado à vida de prateleira de armazenagem melhorada e à capacidade de se nebulizar a proteína de modo

que agregados ordenados superiores não se formem.

Estado da solução dos dAbs de diversificação:

Tendo em vista que a via principal da degradação para todos os três dAbs de diversificação parece ser a auto-associação que leva inicialmente à dimerização, seguida por outra agregação e finalmente à precipitação, as três moléculas de diversificação foram pesquisadas por Ultra-Centrifugação Analítica (AUC) para se determinar o grau de auto-associação. As proteínas foram pesquisadas por dois métodos, equilíbrio de sedimentação e velocidade de sedimentação.

Quanto ao método de equilíbrio de sedimentação, as três amostras foram desenvolvidas em três concentrações diferentes variando de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml com efeitos de centrifugação usando três diferentes velocidades do rotor. Por este método, foi determinado que o DOM1h-131-511 é um dímero estável (26,1 a 34,4 kDa), o DOM1h-131-202 é o equilíbrio do monômero/dímero (22,7 a 27,8 kDa) com estado dimérico relativamente estável nas concentrações medidas com $K_d = 1,3 \mu\text{M}$ e o DOM1h-131-206 é predominantemente monomérico (15,4 a 17,9 kDa) com um K_d para a associação do monômero para dímero de $360 \mu\text{M}$.

Pelo método de velocidade de sedimentação, todas as amostras apresentaram algum grau de dissociação após a diluição. Dos resultados obtidos, mostrados na Figura 34, o coeficiente de sedimentação observado para o DOM1h-131-511 é indicativo de agregados de ordem mais elevada e a mudança de pico após a diluição é uma indicação da dissociação destes agregados. A agregação e a dissociação protéicas cancelam-se entre si, o que pode dar a impressão de ser um dímero estável como observado pelo equilíbrio da sedimentação. Os coeficientes de sedimentação observados para o DOM1h-131-202 são indicativos de um rápido equilíbrio dinâmico e, portanto, os picos monoméricos e diméricos podem não ser separados um do outro, dando o pico único com um coeficiente de sedimentação mais elevado

do que é apropriado para a massa da amostra. Este resultado concorda com o resultado obtido pelo método de equilíbrio de sedimentação, e a constante de dissociação foi medida como sendo de 1 μM . O DOM1h-131-206 foi determinado como sendo mais monomérico do que as outras duas amostras, tendo um coeficiente de sedimentação de 1,9s em comparação com 2,5s para as outras duas amostras. Estes dados concordam com os dados do equilíbrio de sedimentação. Nas concentrações medidas, ~ 10 vezes abaixo da K_d de 360 μM , a amostra predominantemente é monomérica.

EXEMPLO 15

Intensificação da potência do dAb DOM15-26-593:

Um exemplo da intensificação da potência no Ensaio de Ligação do Receptor de VEGFR2 do dAb de DOM15-26-593 através do precursor de DOM15-26, é mostrado na Figura 40. Neste ensaio, a capacidade de um inibidor potencial para prevenir a ligação do VEGF ao VEGFR2, é medida em um ensaio com base em placa. Neste ensaio, uma quimera de VEGFR2-Fc é aplicada sobre uma placa de ELISA de 96 reservatórios, e a esta é adicionada uma quantidade predeterminada de VEGF que havia sido pré-incubada com uma série de diluição do dAb de teste. Em seguida à remoção por lavagem da proteína não ligada, a quantidade de VEGF ligado ao receptor é detectada com um anticorpo anti-VEGF, cujo nível é determinado colorimetricamente. Um efeito de resposta de dose é traçado em gráfico como percentual de inibição da ligação do VEGF como uma função da concentração da substância de teste. Um inibidor eficaz é, portanto, aquele que demonstre bloqueio substancial da ligação do ligando em baixas concentrações.

Potência e meia-vida das Fusões de FC:

O potencial terapêutico do bloqueio de VEGF no tratamento de tumores foi realizado por mais de 30 anos. A natureza crônica do câncer preceitua que os biofármacos necessitam de uma meia vida sérica longa para

mediar seus efeitos, e isto não é consistente com a rápida depuração dos dAbs livres da circulação, mediante filtração renal. Para avaliar a utilidade dos dAbs de VEGF como os anti-angiogênicos para o tratamento do câncer, os anticorpos de domínio de diversificação foram formatados como fusões com o IgG1 Fc humano do tipo selvagem através de um ligador híbrido, de modo a formar uma molécula bivalente com uma meia vida sérica prolongada pelo uso das vias selvagens do anticorpo mediado por FcRn.

Neste formato de fusão de Fc, a potência do dAb selecionado da tripsina de diversificação, o DOM15-26-593, foi comparada com o dAb precursor inicial (DOM15-26) e o dAb lábil de tripsina (DOM15-26-501) com o uso do ensaio anteriormente descrito. Os resultados são apresentados na Tabela 22, abaixo:

Tabela 22: Características de potência (RBA) e meia vida das diversificações do DOM15-26 no formato de fusão de Fc

dAb	Fc	Potência (nM)	T1/2b (horas)
DOM15-26	hIgG1	0,506	ND
DOM15-26-501	hIgG1	0,323	12,9
DOM15-26-593	hIgG1	0,033	84,6

Pode ser observado destes resultados que, no formato de fusão dimérica de Fc, a afinidade e a potência são intensificadas em relação aos dAbs livres devido ao efeito da avidéz. É claro que a intensificação da potência obtida no DOM15-26-593, em virtude da seleção da tripsina, é mantida e é ainda mais pronunciada neste formato de Fc. Além disso, os melhoramentos na estabilidade térmica e da protease traduzem-se em mudanças profundas no comportamento farmacocinético *in vivo* das moléculas. É provável que o melhoramento na meia vida da eliminação (ver Figura 4) do DOM15-26-593, em comparação com DOM15-26-501, seja uma consequência direta da estabilidade aumentada do dAb, tornando-o mais resistente aos processos de degradação que ocorram dentro do compartimento endossômico. É também de se esperar, portanto, que os dAbs com estabilidade de protease intensifica, sejam capazes de perseverar por mas

tempo em outros compartimentos biológicos, tais como o soro, as superfícies mucosas e os vários compartimentos teciduais onde a proteólise seja um processo ativo envolvido na movimentação das moléculas biológicas.

Perfis de depuração farmacocinética:

5 Os perfis de depuração farmacocinética do DOM15-26-593 e do DOM15-26-501 foram medidos após a administração intravenosa dos DOM15-26-593 e DOM15-26-501 a 3 ratos nas concentrações de 5 mg/kg. Os níveis de DOM15-26-593 e DOM15-26-501 no soro foram então medidos com o uso do ensaio ELISA padrão de ligação direta a VEGF, e um anticorpo
10 de Fc anti-humano, e portanto apenas medicamento intacto nas amostras de soro foram detectados. O perfil farmacocinético completo é mostrado na Tabela 23, abaixo:

Tabela 23: Resumo dos parâmetros farmacocinéticos das fusões de Fc nos DOM15-26-501 e DOM-15-26-593.

DAb	Vida média (horas)	C _{max} (µg/ml)	AUC (0-Mf) (hr*µg/ml)	Dispensação (ml/hr/kg)
DOM15-26-501	12,9	91,4	445,1	11,8
DOM15-26-593	84,6	101,8	3810	1,3

15 Pode-se observar destes resultados que DOM1h-131-593 tem um perfil farmacocinético significativamente melhorado, por exemplo, com uma meia-vida prolongada, e índice de depuração reduzido.

A potência significativamente melhorada e as propriedades farmacocinéticas do DOM15-26-593 resultaram na análise do composto para
20 uma faixa de outros atributos biofísicos.

Propriedades do estado da solução: Análise por SEC-MALLs e AUC:

As experiências foram feitas com DOM15-26-593, como segue:

25 O DOM15-26-593 se comporta como um monômero na solução nas concentrações de até 2,5 mg/ml, com uma massa molecular calculada de 78 a 81 KDa, consistente com a massa molecular intacta

calculada de aproximadamente 76 kDa (Figuras 42a e 42b).

Propriedades da Fusão Térmica: Análise por DSC

As experiências foram realizadas com o DOM15-26-593 como segue:

5 A estabilidade térmica aumentada do dAb selecionado na tripsina (65 °C, painel central da Figura 43) é mantida na fusão de Fc (64,5 °C, painel superior da Figura 43). A curva da T_m do dAb do DOM15-26-501 (52 °C, painel inferior da Figura 43) é mostrada para comparação.

10 Estabilidade ao Congelamento-Descongelação, estresse da temperatura e componentes séricos

As experiências foram realizadas com o DOM15-26-593 como segue:

15 As propriedades da estabilidade do dAb do DOM15-26-593 significam que o dAb do DOM15-26-593 pode ser submetido ao estresse físico e biológico com efeitos mínimos em sua capacidade de ligar-se ao VEGF [Figuras 44 a 47 (a e b)]. Por exemplo, a molécula pode ser repetidamente congelada e descongelada do nitrogênio líquido (-196 °C) até a temperatura do corpo (37 °C) por 10 ciclos, sem perda da atividade de ligação, como determinado por ELISA (Figura 44). Este tratamento também
20 resultou em nenhuma alteração óbvia no estado de agregação das moléculas, como avaliado pela cromatografia de exclusão de tamanho convencional (Figura 45). Outros testes demonstraram que a molécula pode ser colocada em uma faixa de diferentes temperaturas, de -80 °C a 55 °C com apenas uma queda secundária na atividade de ligação a antígeno após 168 horas apenas na
25 temperatura de incubação mais elevada (Figura 46). Além disso, a incubação com soro de seres humanos ou de macacos cinomolgos em 37 °C por 14 dias, não causou nenhuma perda da capacidade de ligação a antígeno (Figuras 47a e 47b), como determinado pelo ELISA de ligação do VEGF.

Potência no Ensaio de Ligação do Receptor de VEGFR2 e no

ensaio celular de HUVEC:

O ensaio de ligação ao receptor descrito acima foi usado para avaliar a potência das fusões de Fc (Figura 48). Foi observado que o dAb do DOM15-26-593 havia intensificado a potência neste ensaio, o que estabelece a capacidade do dAb de bloquear a ligação do VEGF ao VEGFR2 *in vitro*. A 5
potência do DMS1529 foi também demonstrada em um ensaio de HUVEC (Célula Endotelial da Veia Umbilical Humana), em que a capacidade dos antagonistas do VEGF para bloquear a proliferação estimulada pelo VEGF das células HUVE é medida. Os números celulares são determinados no final 10
de um período de incubação fixado, com uma quantidade predeterminada de VEGF e uma quantidade variável do artigo de teste. Quanto mais potente o antagonista, menor a proliferação celular observada (Figura 49).

A sequência de nucleotídeos do DOM1h-131-511 é apresentada neste parágrafo.

15 Sequência de nucleotídeos do DOM1h-131-511:

GAGGTGCAGC	TGTTGGAGTC	TGGGGGAGGC	TTGGTACAGC	CTGGGGGGTC	CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG	CCTCCGGATT	CACCTTTGCG	CATGAGACGA	TGGTGTGGGT	CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG	GTCTAGAGTG	GGTCTCACAT	ATTCCCCGG	TTGGTCAGGA	TCCCTTCTAC
GCAGACTCCG	TGAAGGGCCG	GTTACCATC	TCCC GCGACA	ATTCCAAGAA	CACGCTATAT
CTGCAAATGA	ACAGCCTGCG	TGCCGAGGAC	ACAGCGGTAT	ATTACTGTGC	GCTGCTTCCT
AAGAGGGGGC	CTTGGTTTGA	CTACTGGGGT	CAGGGAACCC	TGGTCACCGT	CTCGAGC

REIVINDICAÇÕES

1. Domínio variável único de imunoglobulina tipo 1 do receptor anti-TNF α (TNFR1; p55), caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é idêntica à sequência de aminoácidos do DOM1h-131-206 (SEQ ID NO: 4).

2. Domínio variável único de imunoglobulina de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ácido aspártico na posição 53, em que a numeração se acha de acordo com Kabat.

3. Domínio variável único de imunoglobulina de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende histidina na posição 91, em que a numeração se acha de acordo com Kabat.

4. Antagonista tipo 1 do receptor TNF α (TNFR1; p55) caracterizado pelo fato de que compreende um domínio variável único de imunoglobulina anti-TNFR1 como definido em qualquer reivindicação precedente.

5. Uso de um domínio ou antagonista de TNFR1 como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para tratar e/ou para a profilaxia de uma condição inflamatória.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida condição inflamatória ser selecionada dentre: doença pulmonar, psoríase, artrite e doença inflamatória intestinal.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida condição inflamatória ser selecionada dentre: inflamação pulmonar, DPOC, asma, pneumonia, fibrose cística, doença pulmonar intersticial, alergia, choque séptico.

8. Ácido nucleico recombinante, caracterizado pelo fato de que codifica um polipeptídeo compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina como definido na reivindicação 1 e que tem a sequência

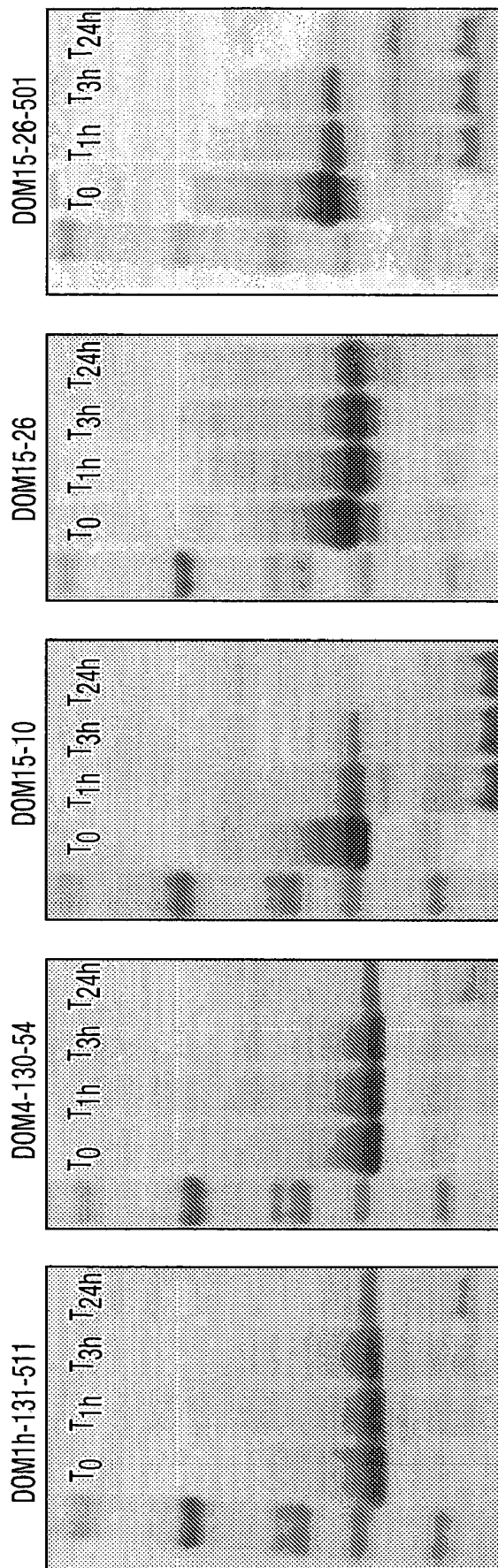
mostrada na SEQ ID NO: 226.

9. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico como definido na reivindicação 8.

10. Célula hospedeira bacteriana ou de levedura, caracterizada pelo fato de que compreende o ácido nucleico como definido na reivindicação 8 ou vetor como definido na reivindicação 9.

11. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um domínio variável único ou um antagonista de imunoglobulina como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e um carreador, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitáveis.

Fig.2.



DOMh-131-511	EVQLLESGGCLVQPGGSLRLSCAASGFTFRHETMWRQAPCKGLEWYSHIPPVOGDPFADSVKGRFTISRDNKNTIIYLQMNSLRAEDEAVYFCALLPARGPEFVNGQGTLYVSS	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
1-1	M											
1-2	A											
1-3	N											
DOMh-131-201												
1-5									N			
1-6						A			S	G		
1-7						A						
DOMh-131-202						D						
DOMh-131-203	W					D						I
DOMh-131-204	S					D						N
DOMh-131-205						D						Q
1-12	R	T				D			S			Q
1-13	R	E				DS						R
1-14			I									R
1-15												R
DOMh-131-206						D						H
1-18						D						
1-19		T				D						
1-20						SD						K
1-21						D						
1-22			R									
1-23			Q									R
1-24												K
1-25						A						R

Fig.7A.

DOM1h-131-511

100 mg/ml de tripsina - 1 hora

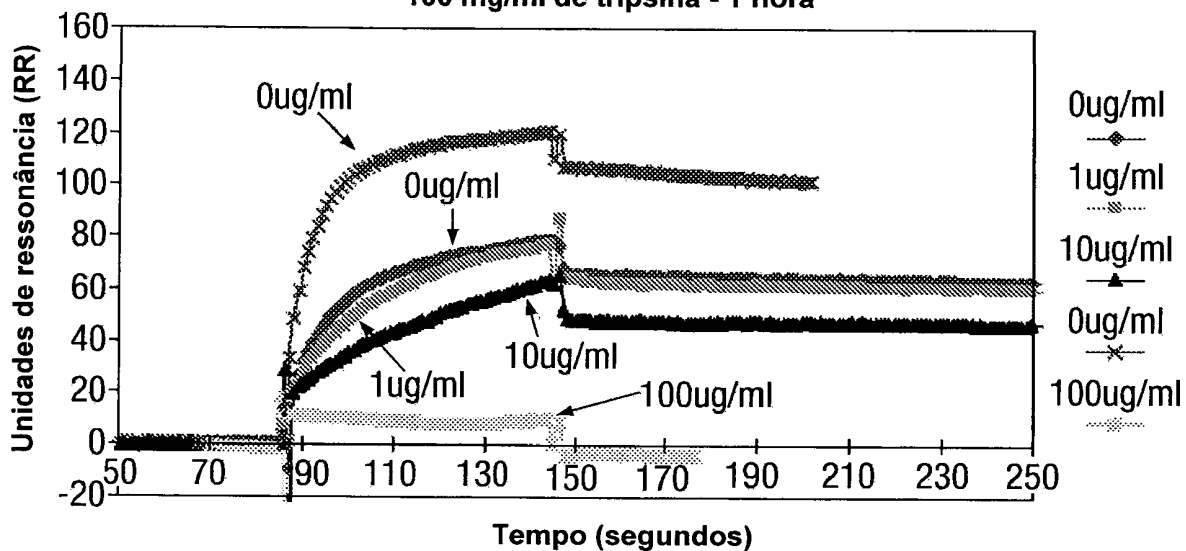


Fig.7B.

DOM1h-131-203

100 mg/ml de tripsina - 1 hora

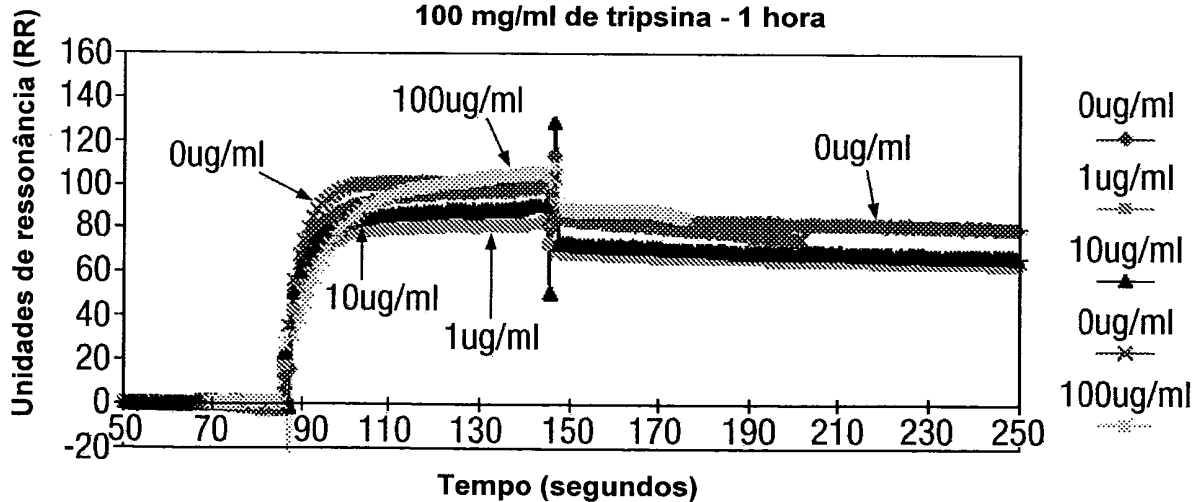


Fig.7C.

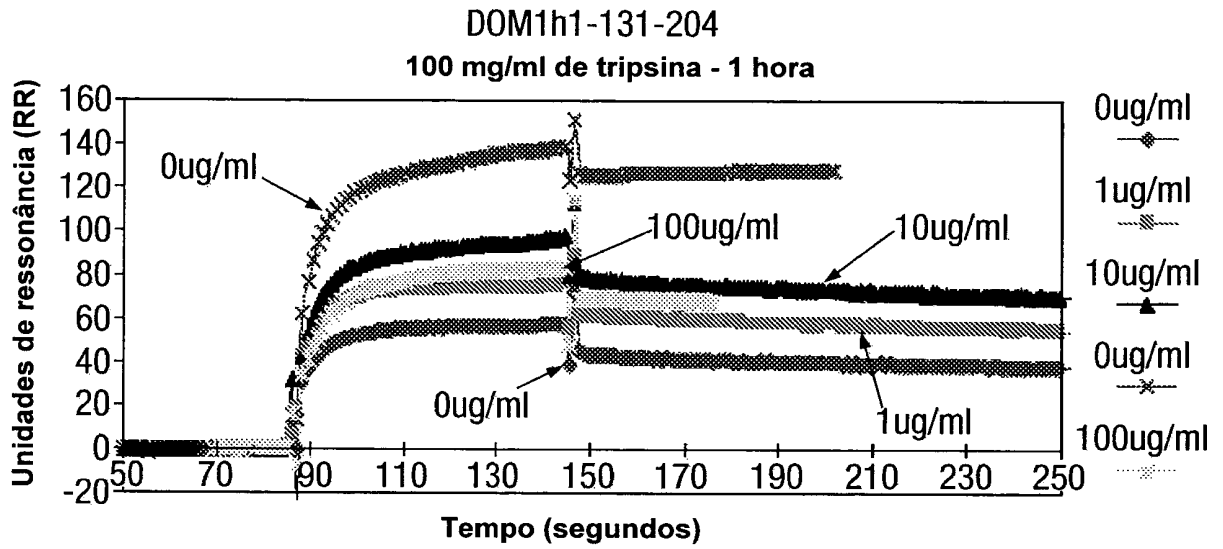


Fig.7D.

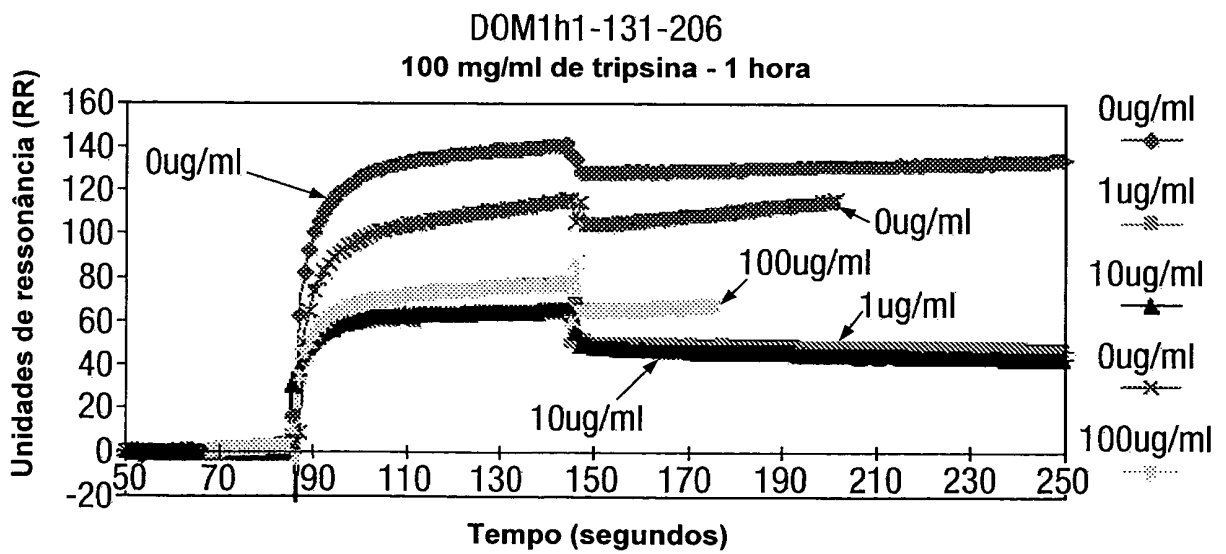


Fig.8A.

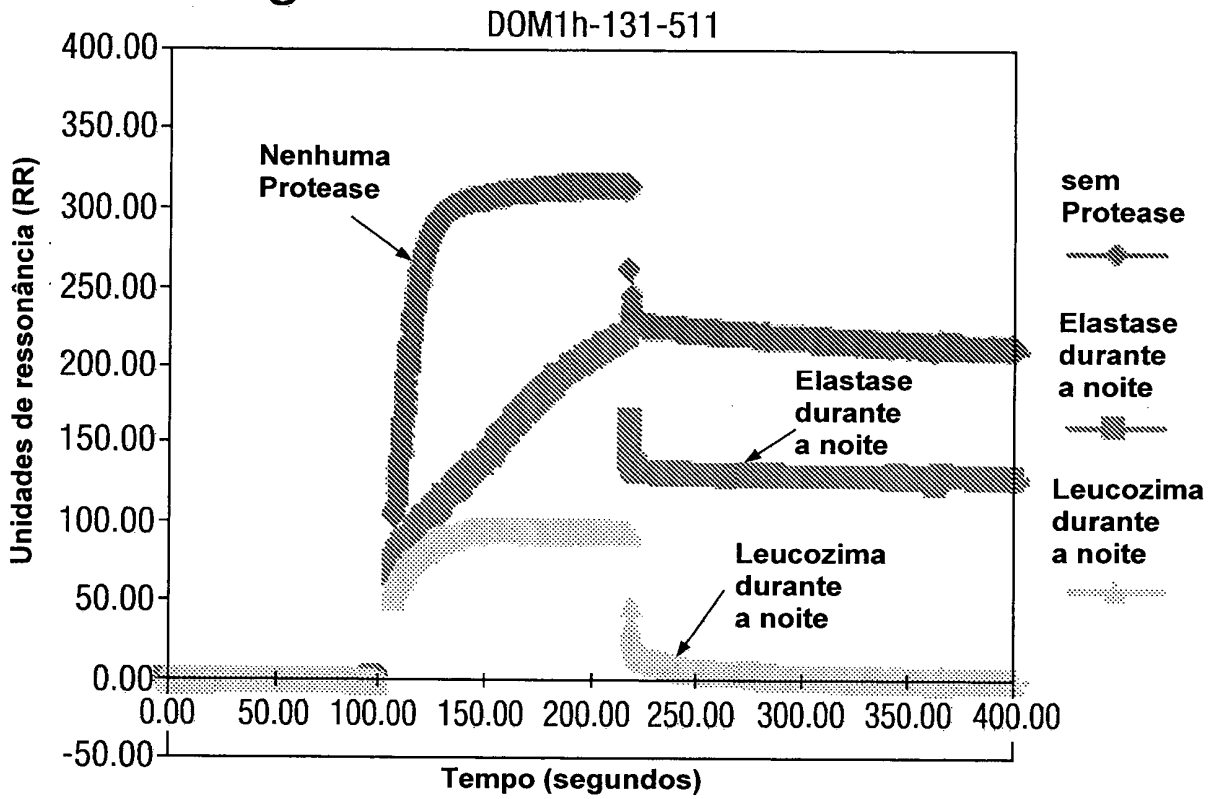


Fig.8B.

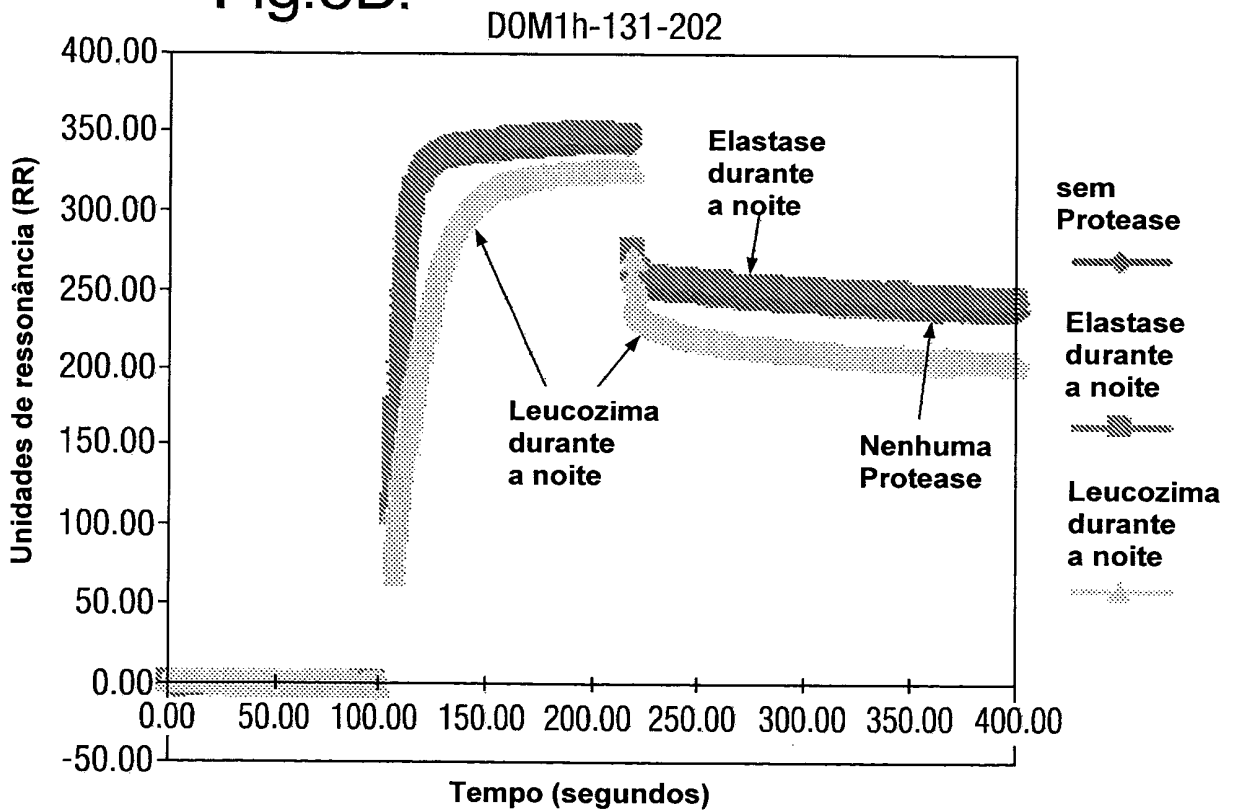


Fig.8C.

DOM1h-131-206

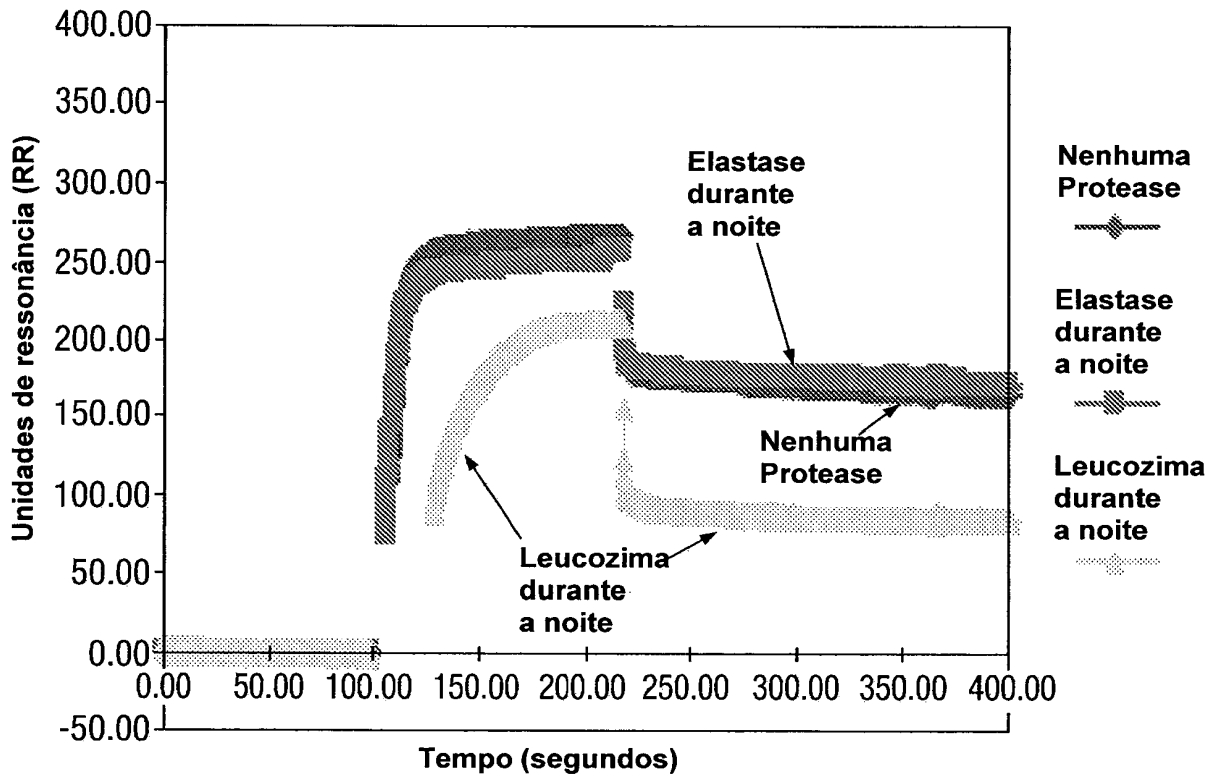
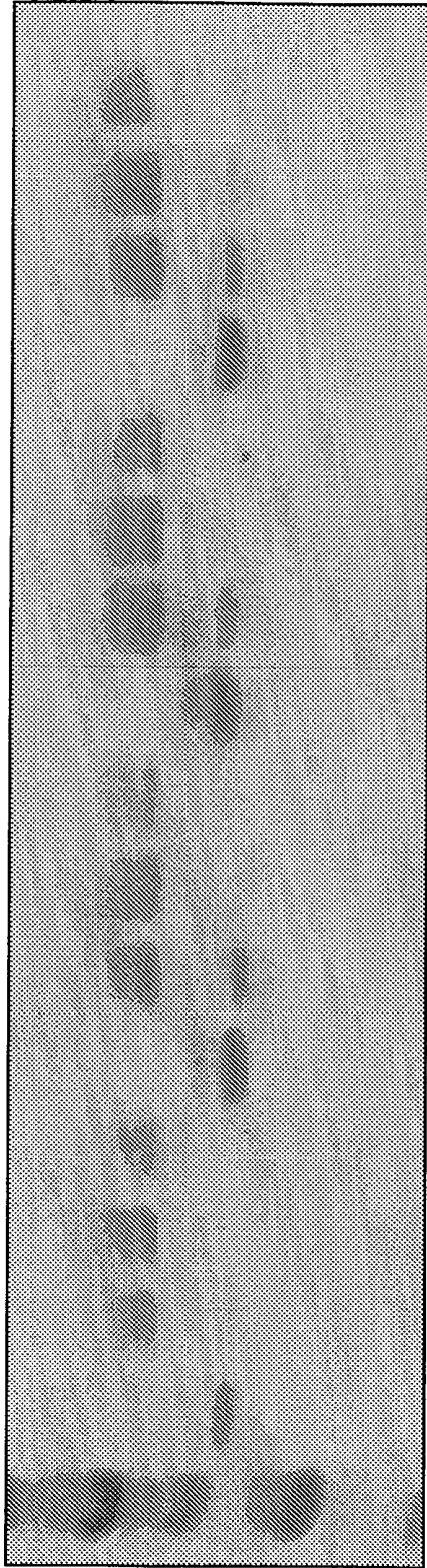


Fig.9.



0 1 3 24 0 1 3 24 0 1 3 24
DOM1h-131-511 DOM1h-131-203 DOM1h-131-204 DOM1h-131-206



0 1 3 24 0 1 3 24 0 1 3 24
DOM4-130-54 DOM4-130-201 DOM4-130-202

Fig.10A.

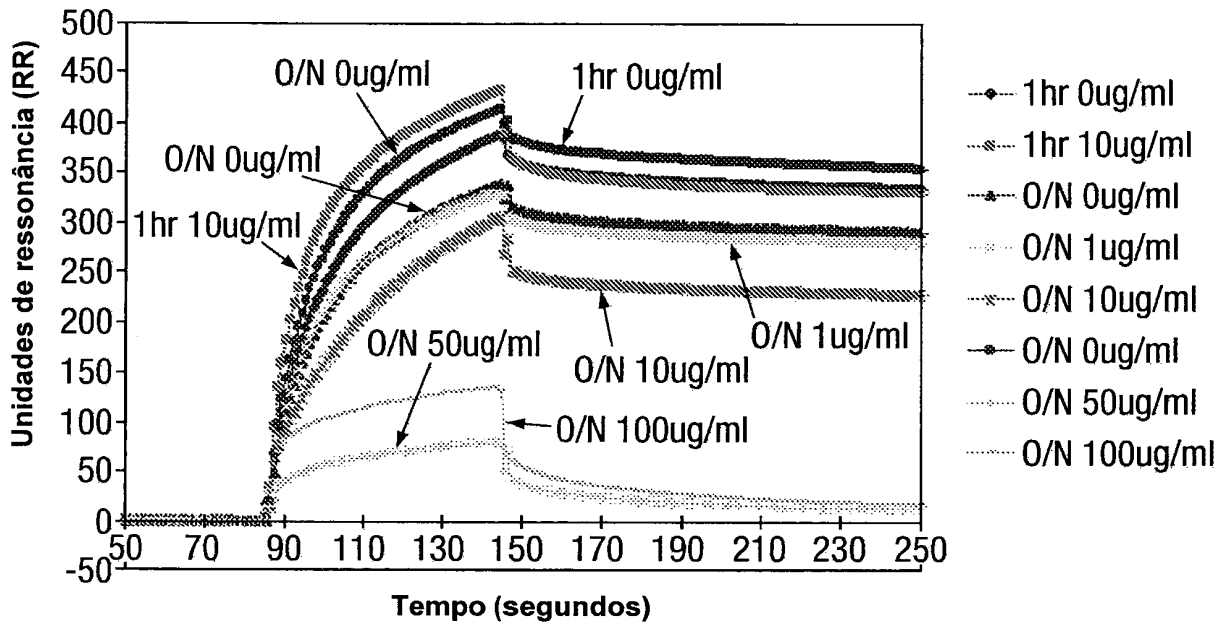


Fig.10B.

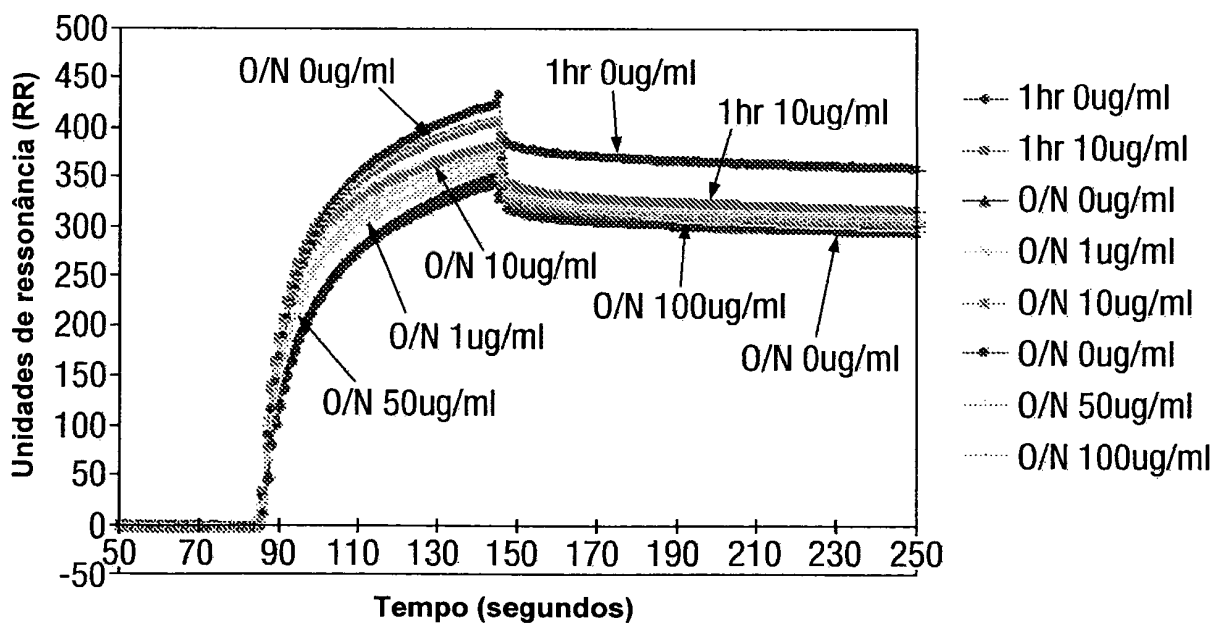


Fig.10C.

DOM4-130-202

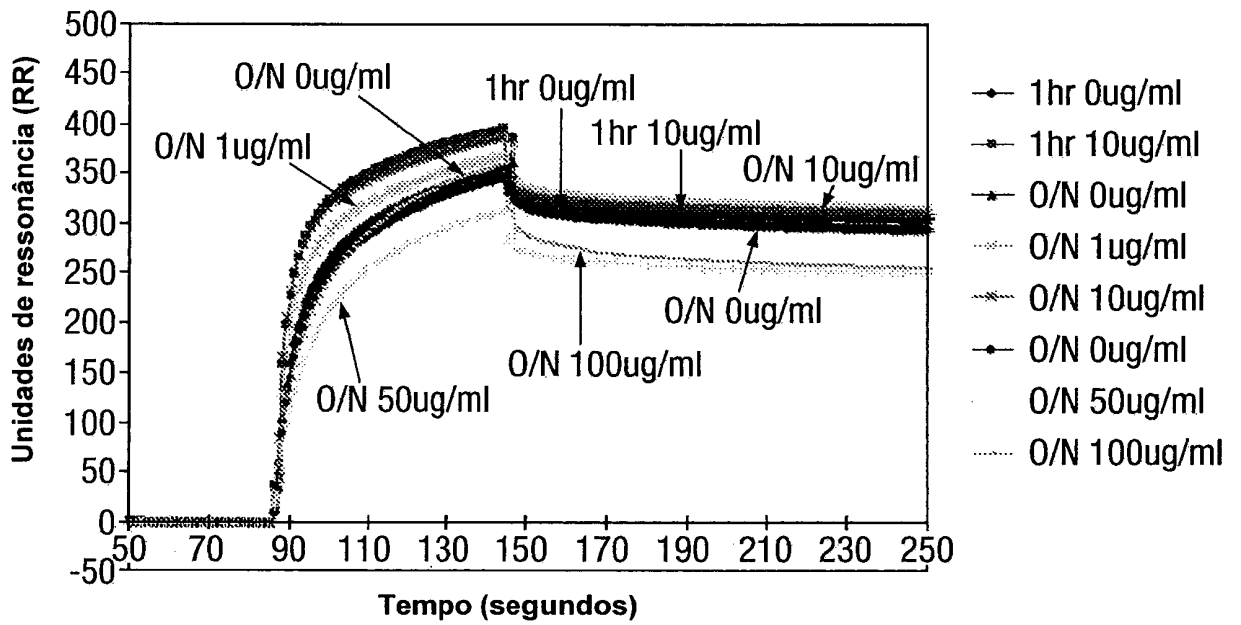
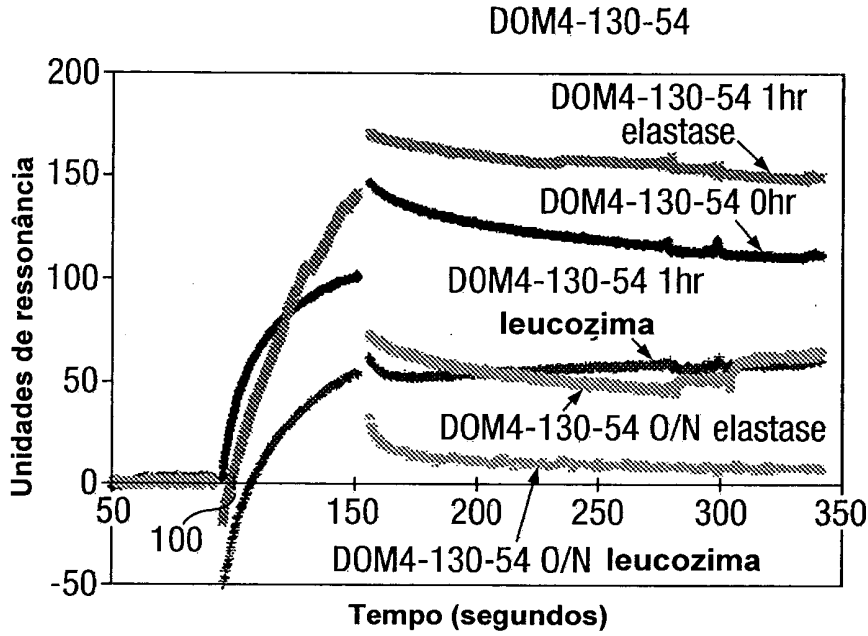
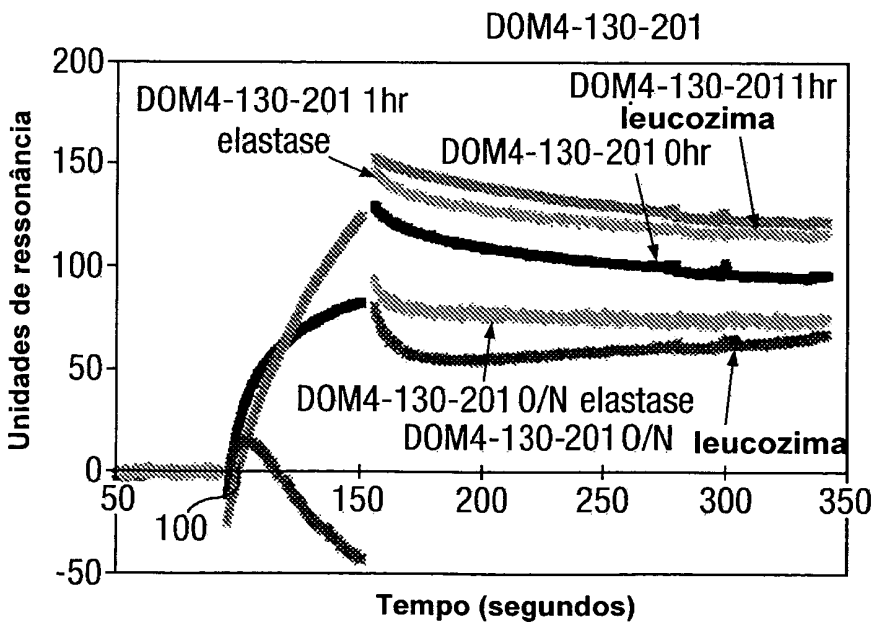


Fig.11A.



- DOM4-130-54 0hr
- DOM4-130-54 1hr elastase
- DOM4-130-54 1hr leucozima
- DOM4-130-54 0/N elastase
- DOM4-130-54 0/N leucozima

Fig.11B.



- DOM4-130-201 0hr
- DOM4-130-201 1hr elastase
- DOM4-130-201 1hr leucozima
- DOM4-130-201 0/N elastase
- DOM4-130-201 0/N leucozima

Fig.11C.

DOM4-130-202

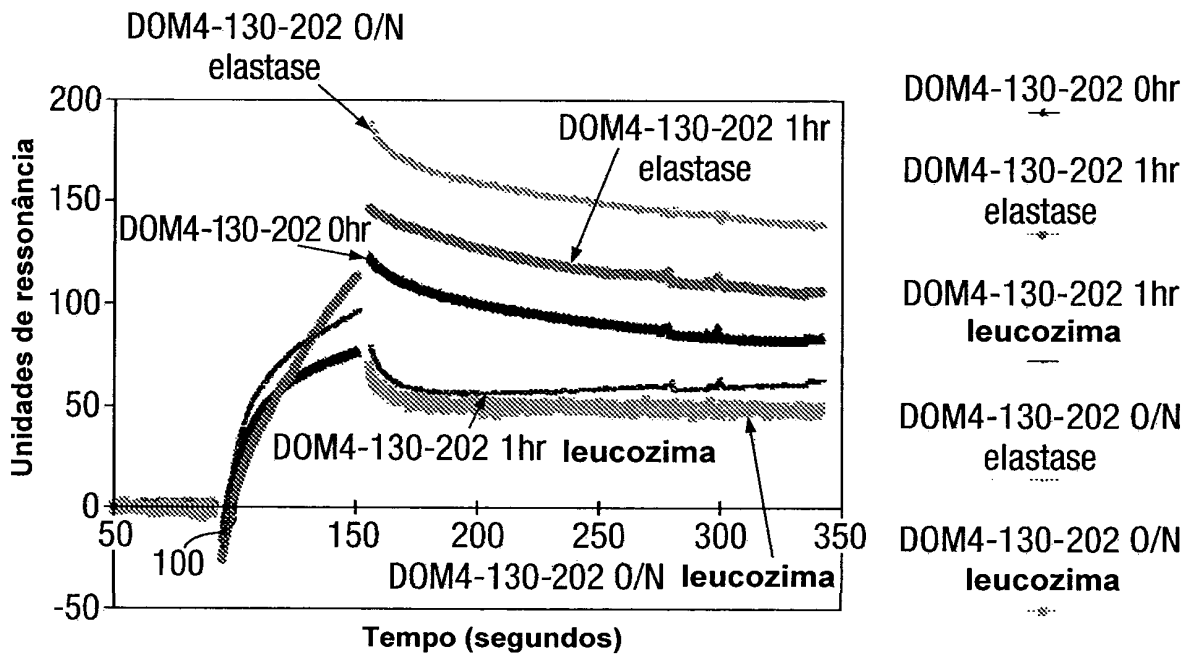


Fig.12.

VH Dummy102030405060708090100110
DOM15-26-555
DOM15-26-588
DOM15-26-589
DOM15-26-591
DOM15-26-593
DOM15-26-594
DOM15-26-595

EVQLLESGGGLVQP...
 ...SS...
 ...K...
 ...K...
 ...V...
 ...V...
 ...V...

Fig.13A.

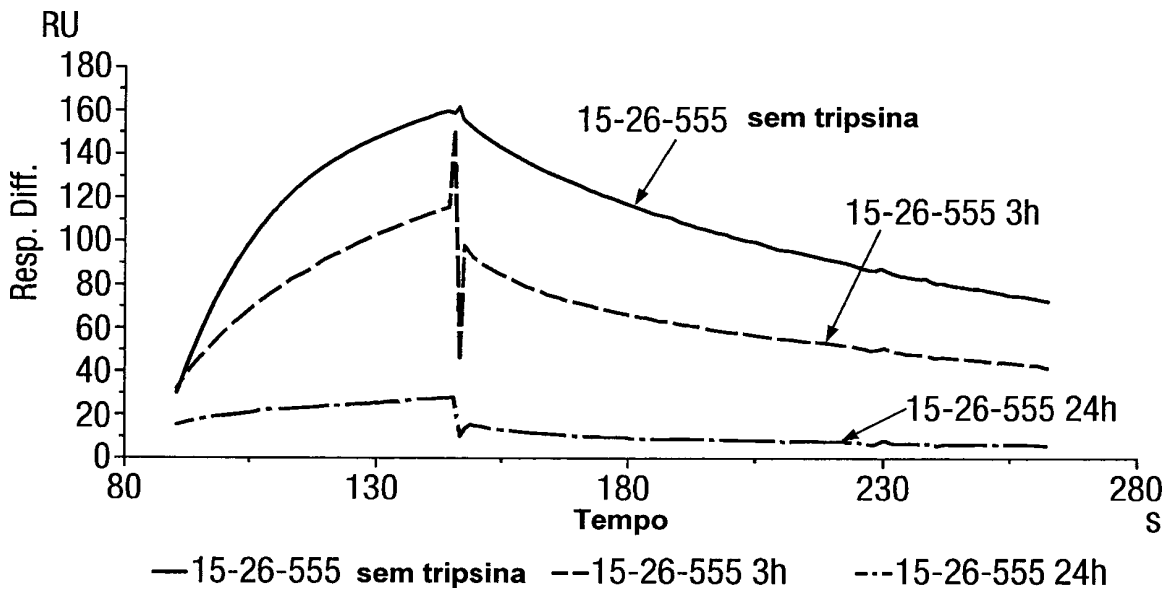


Fig.13B.

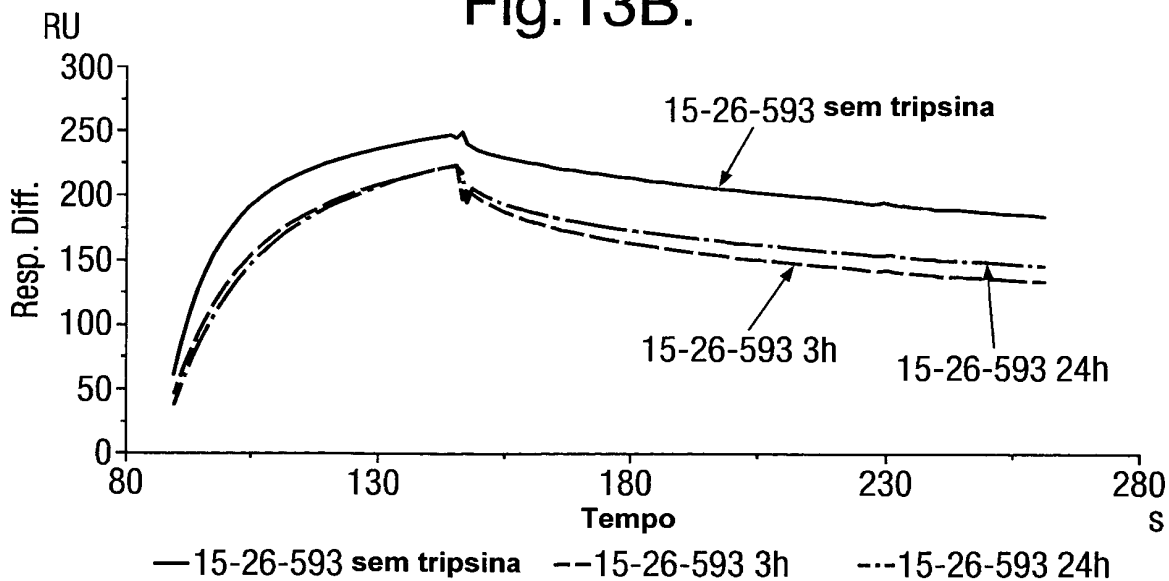


Fig.14.

influência do tratamento com tripsina na ligação hVEGF pelas variantes DOM-15-26-555 precedentes

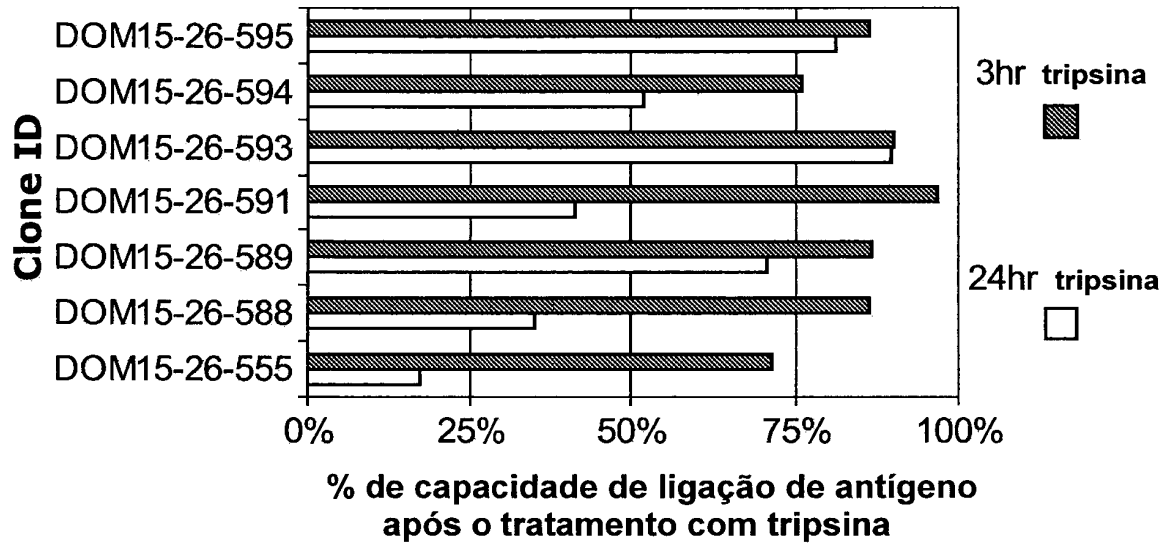


Fig.15.

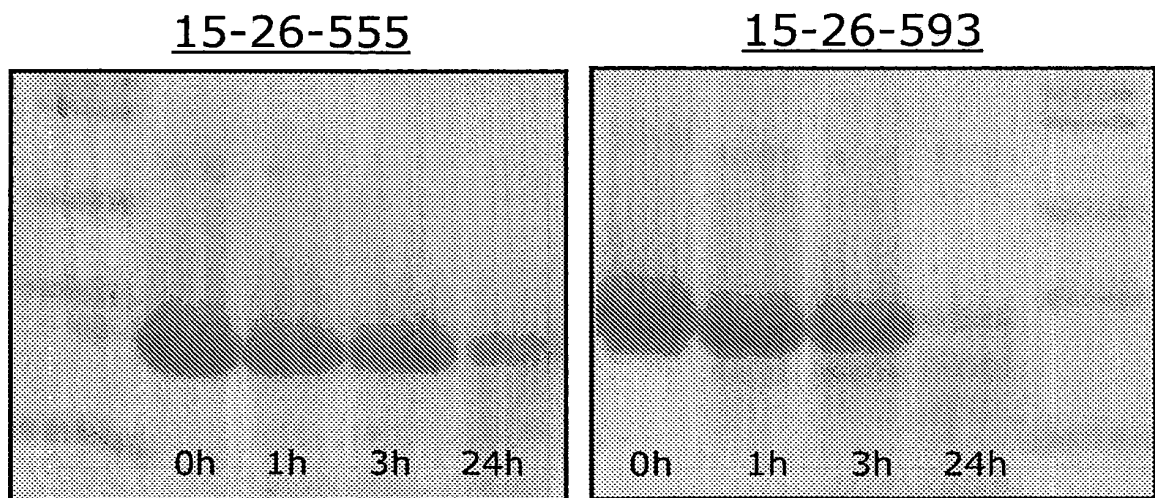


Fig.17A.

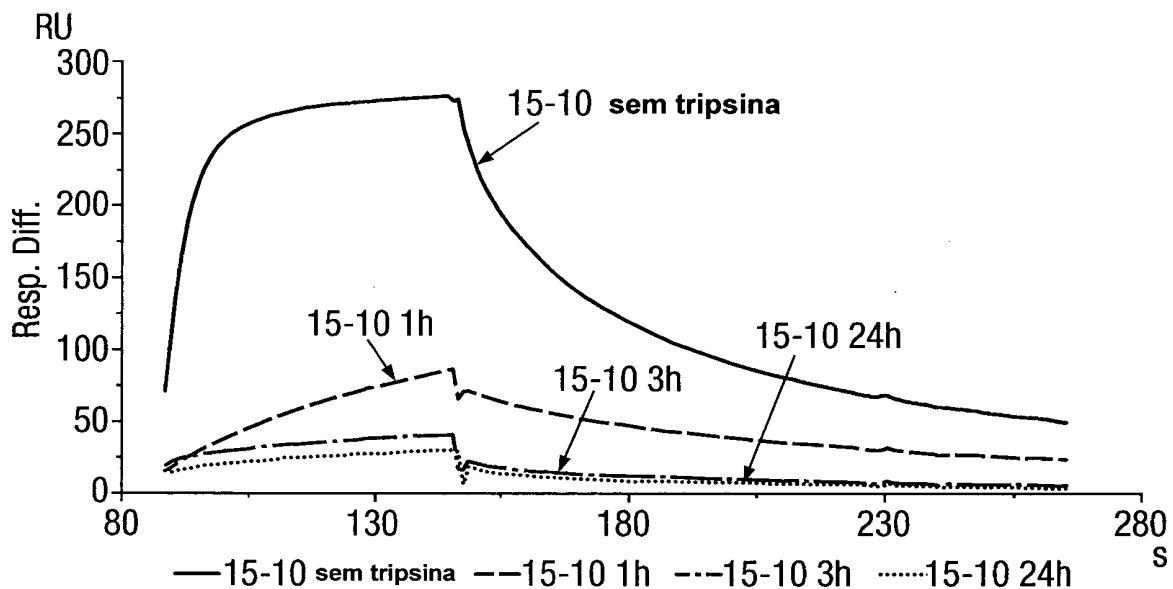


Fig.17B.

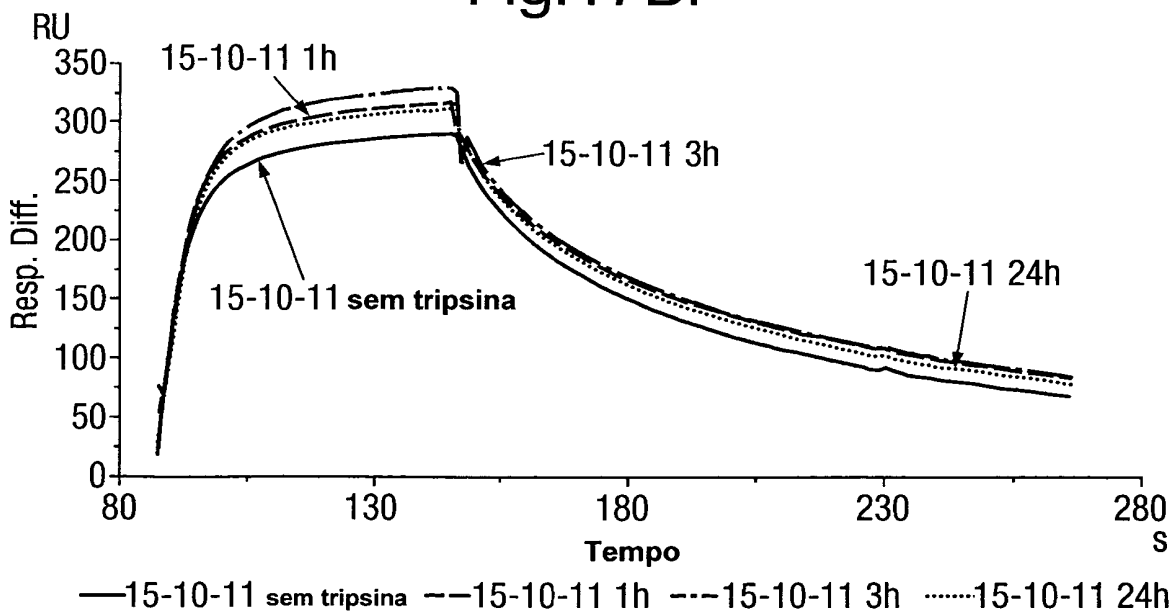


Fig.18.

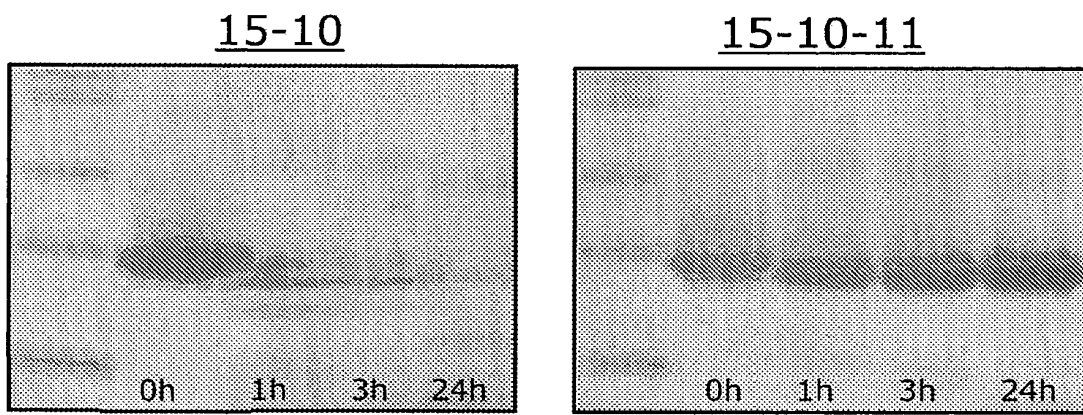


Fig.19A.

Sequências derivadas de DOM1h-131-511

>1-1

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCATGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-2

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCGCCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGAGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-3

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCAACTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-201

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACGATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

Fig.19B.

>1-5

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAACCT
GCGCGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTGAC
TACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-6

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAGCACGCTATATCTGCAAATGAACGG
CCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTT
GACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-7

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-202

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGACGGTCAAGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

Fig.19C.

>DOM1h-131-203

GAGGTGCAGCTGTGGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATGGTACAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGATTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-204

GAGGTGCAGCTGTCCGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCAGATGGTACAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAATAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-205

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATGGTACAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-12

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTACAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATGGTACAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGAGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAGATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTGTATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGAGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCGAGCG

Fig.19D.

>1-13

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGAGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATAGCCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGGGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACAGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-14

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCATGCGCATGAAACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACCGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-15

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCTCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTGAC
TACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-206

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATCACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Fig. 19E.

>1-18

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCGGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-19

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCACCGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AGGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-20

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
GGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCTCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTCG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-21

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Fig.19F.

>1-22

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCGTGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-23

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCAAGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAAGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-24

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCTTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-25

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGCTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Fig.19G.

Sequências derivadas de DOM1h-130-54

>4-1

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCT
AAGCTCCTGATCAATCTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGA
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-2

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCT
AAGCTCCTGATCAATTTTGGCTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGCGGA
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCCAGGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-3

GACATCCAGACGACCCAGTCTCCGTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-4

GACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAACTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCCGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-5

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCT
AAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGA
TACGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATATCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGGGG

Fig. 19H.

>4-6

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCGGCATCTGAAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTCGCTACGTACTACTG
 TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-7

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCGTCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
 TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-8

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGGATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
 TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCGAGGGACCAGGGTGGAAATCAAACGGG

>4-9

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAGTTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
 TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTACAGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>DOM4-130-201

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
 TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAATGGG

Fig.19l.

>4-11

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTATGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCACCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-12

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATATACTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCACCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG

>4-13

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTTCGCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCATATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG

>4-14

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACTATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
AAGTCTCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-15

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCATATACGTTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG

Fig. 19J.

>4-16

GACATCCAAATGGCCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTGGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAGCCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAG
G

>4-17

GACATCCAGATGACCCAGTCACCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGACATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
G

>4-18

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCGTCTGTAGGAGACCGTGTCCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACCTG

>4-19

GACATCCAGATAACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACCG

>4-20

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAG

Fig.19K.

>DOM4-130-202

GACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACCATCTC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTTCCTTCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTCCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>4-22

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>4-23

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGAGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAATCGG

>4-24

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATATGTAGGAGACCGTGTCCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGGTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>4-25

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACCATCAC
TTGTCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGGTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

Fig.19L.

>4-26

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCGTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCTTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTAGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGT

>4-27

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATCTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

Fig.20A.

>DOM15-26-555

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-576

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-578

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACCGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-579

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGATCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCAAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-580

GAGGTGCAGCTGCTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAT
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGAAATACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-581

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCGGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAATGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-582

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACATTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACGGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAACGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Fig.20B.

>DOM15-26-583

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACTACTAC
 GCATACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCATGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-584

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCTGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGAGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACTACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-585

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACTACTAC
 GCAGAGTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTACGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-586

GAGGTGCAGTTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACTACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATTTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-587

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACTACTAC
 GCAAATCCGTGAAGGGTTCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-588

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACTACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTCTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-589

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATCTCGCCTTCGGGTCTTATACTACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCGAGC

Fig.20C.

>DOM15-26-590

GAGGTGCATCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCCGTCTCGAGC

>DOM15-26-591

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCCGTCTCGAGC

>DOM15-26-592

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTACGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCCGTCTCGAGC

>DOM15-26-593

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTACCCGTCTCGAGC

>DOM15-10

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

>DOM15-10-1

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATCATTTCGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTGAGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-2

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
 ATCACTTGTCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

Fig.20D.

>DOM15-10-3

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCACCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTAGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAAGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG

>DOM15-10-4

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCAGTAAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTTTTACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCCA
GGGACCAAGGTGGAAATTAGACGG

>DOM15-10-5

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCGAAGTGGGGTCCCATCT
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG

>DOM15-10-6

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTACAGAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GCAGATTTTGCAACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-7

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTTGGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAA

>DOM15-10-8

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACTT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCTGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGAGGG

>DOM15-10-9

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGTTTCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTGCAACCT
GGAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

Fig.20E.

>DOM15-10-10

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTATCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-11

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGAGGG

>DOM15-10-12

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAAGCT
GAAGATTTCTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAACCAGACGG

>DOM15-10-13

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGAAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
CGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

>DOM15-10-14

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTACGTTGGTACCAGCATAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCTCCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTCGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG

>DOM15-10-15

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAGGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTTGGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-16

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTACGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTTCGGCCAA

Fig.21.

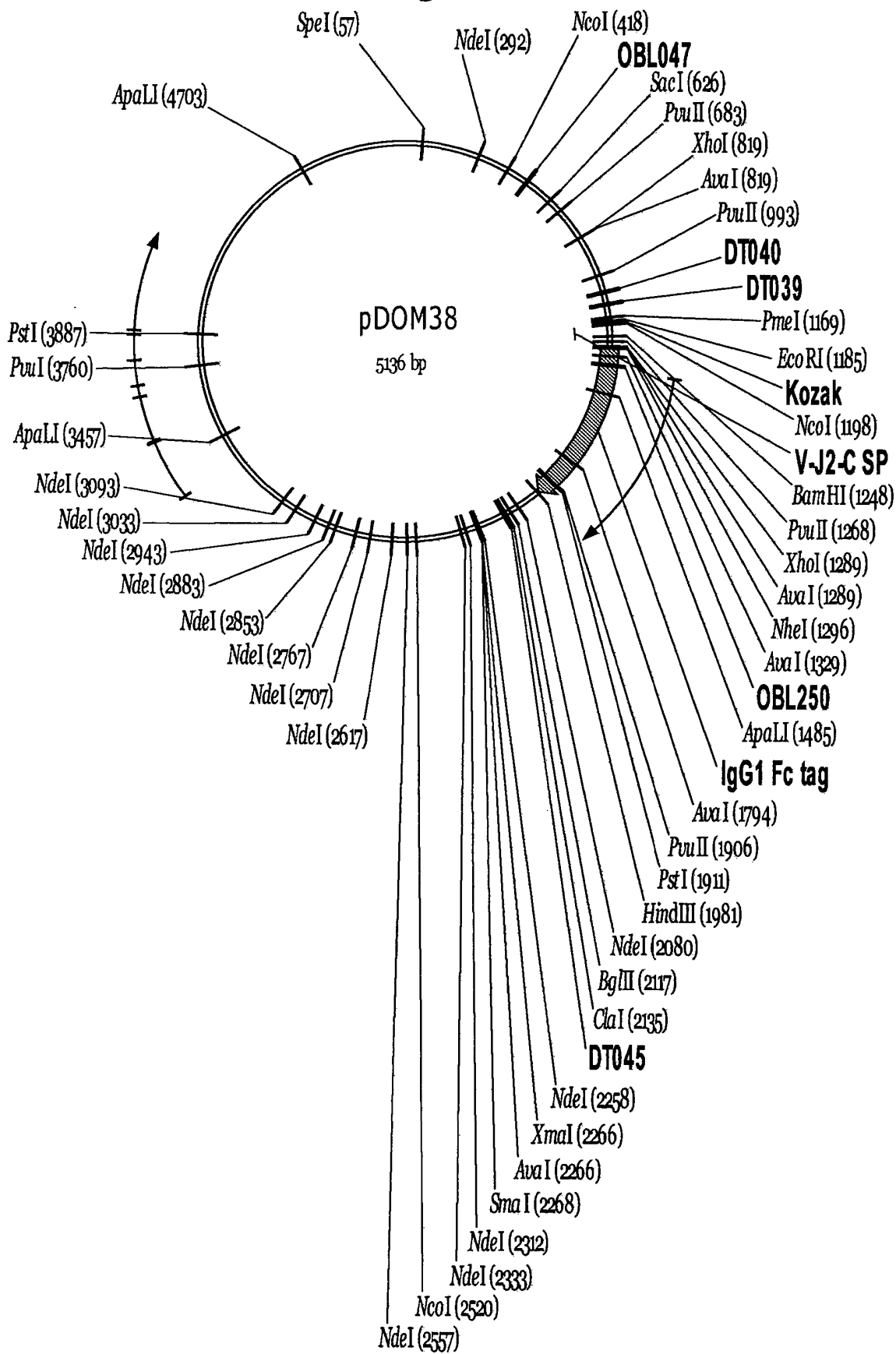


Fig.22.

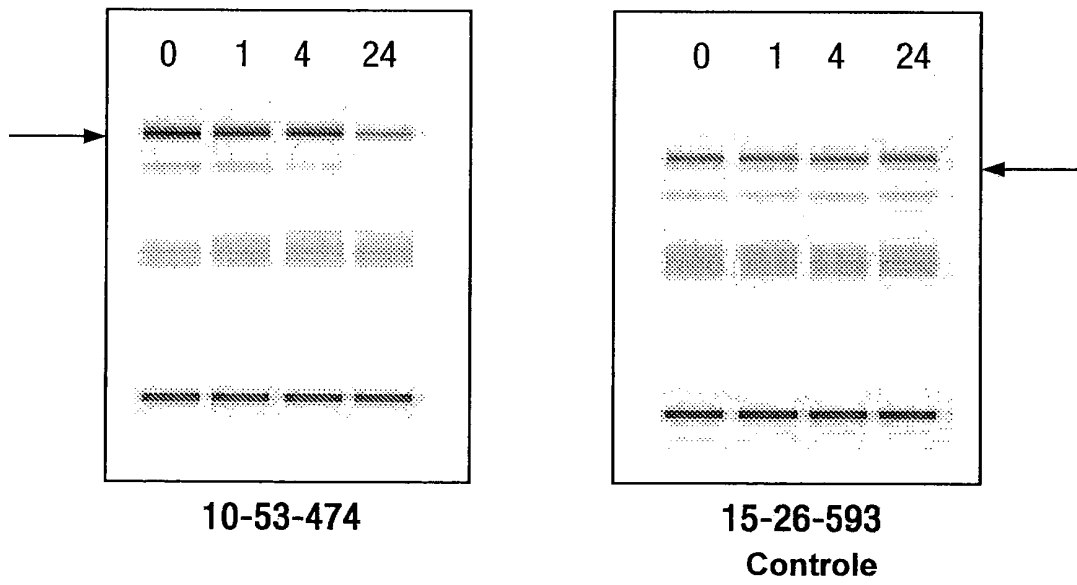


Fig.23.

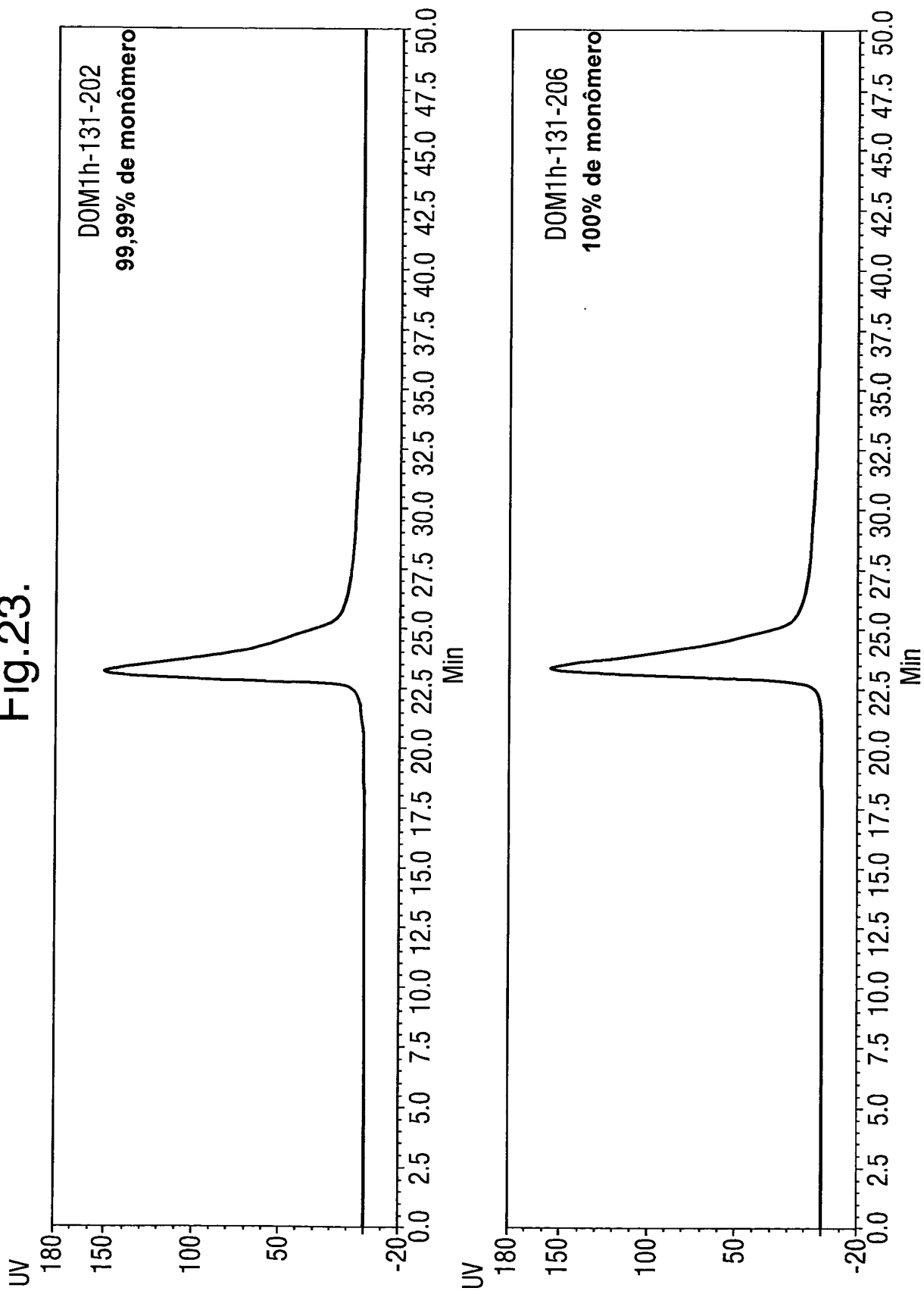


Fig.23 (Cont).

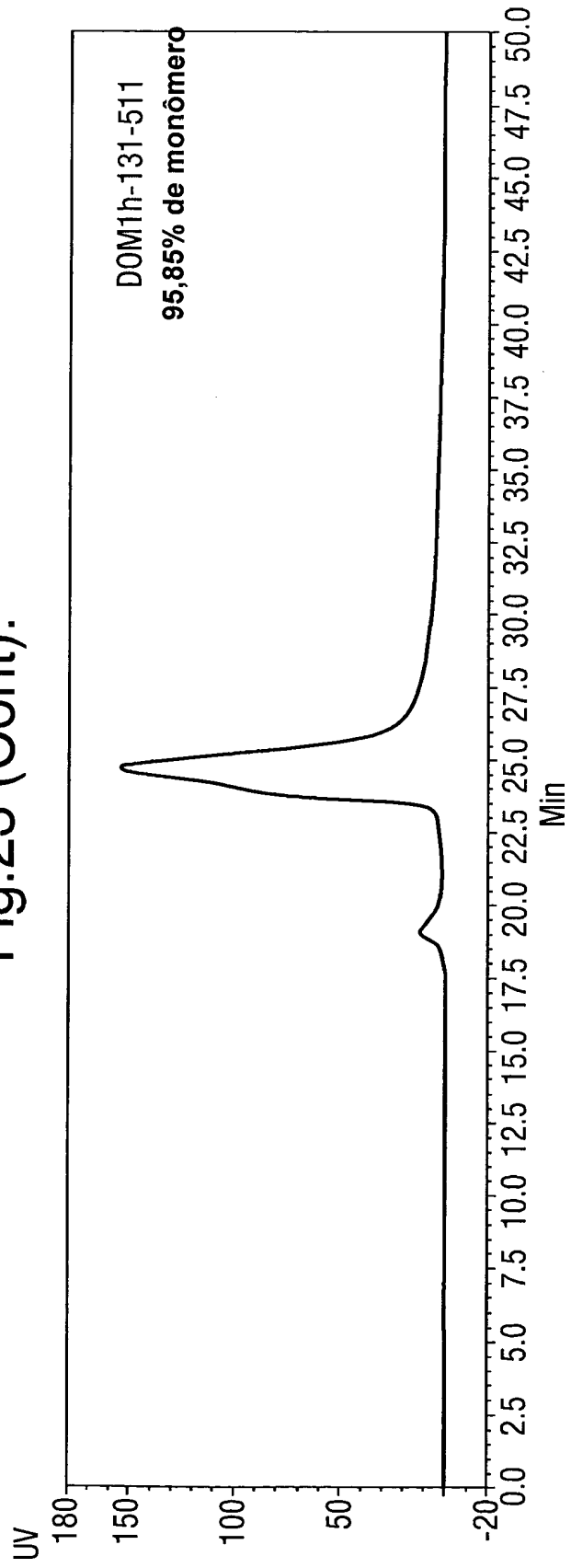


Fig.24.

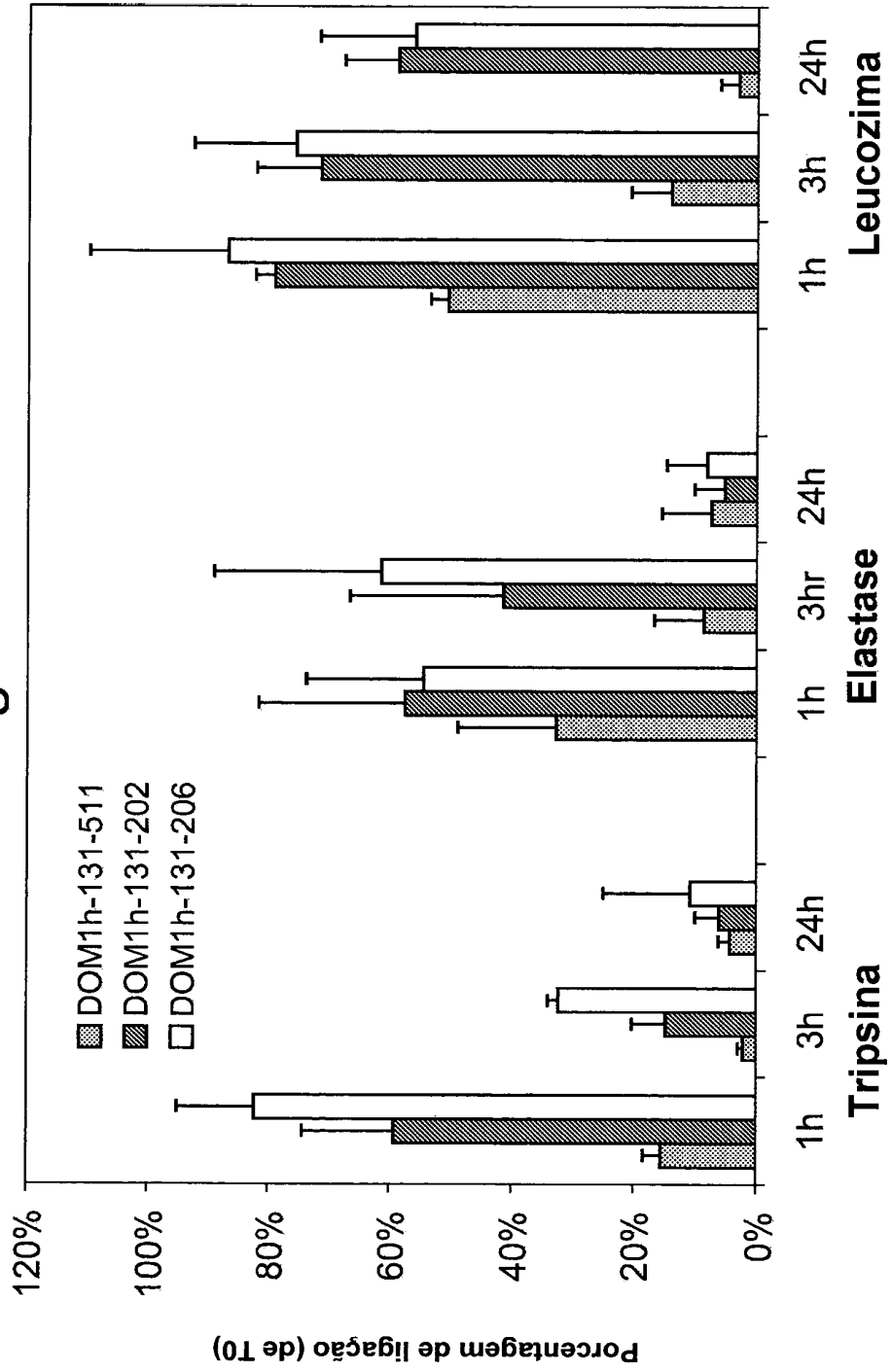


Fig.25.

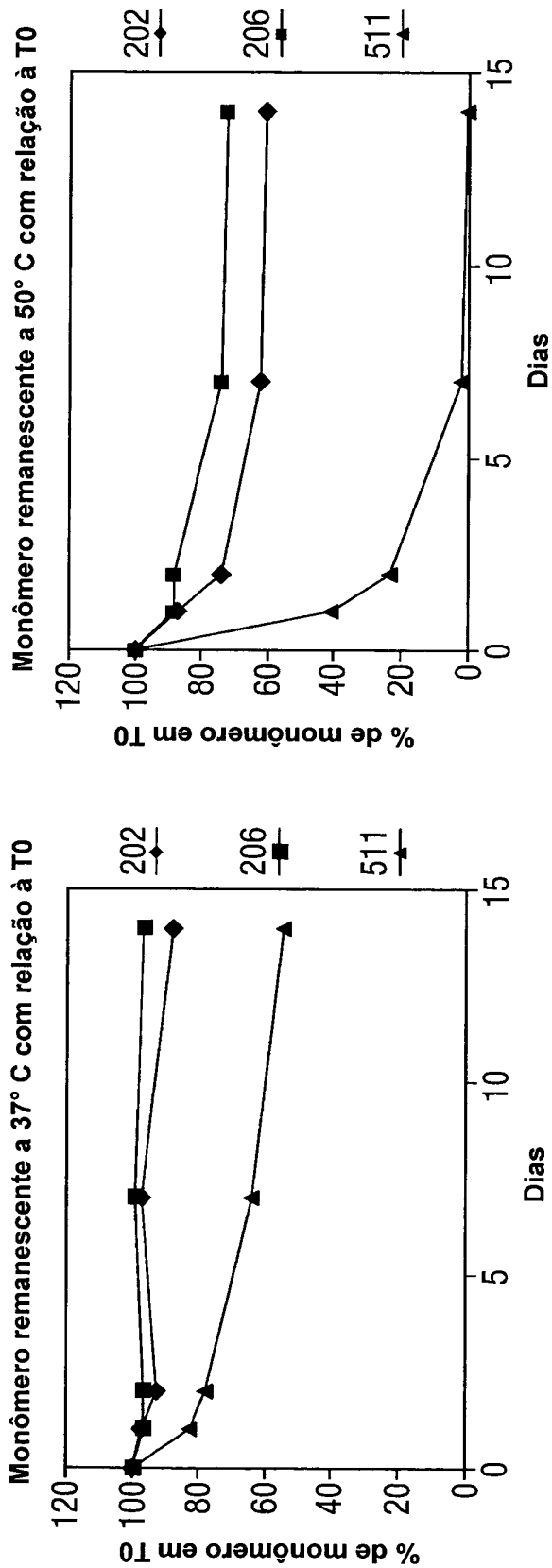


Fig.26.

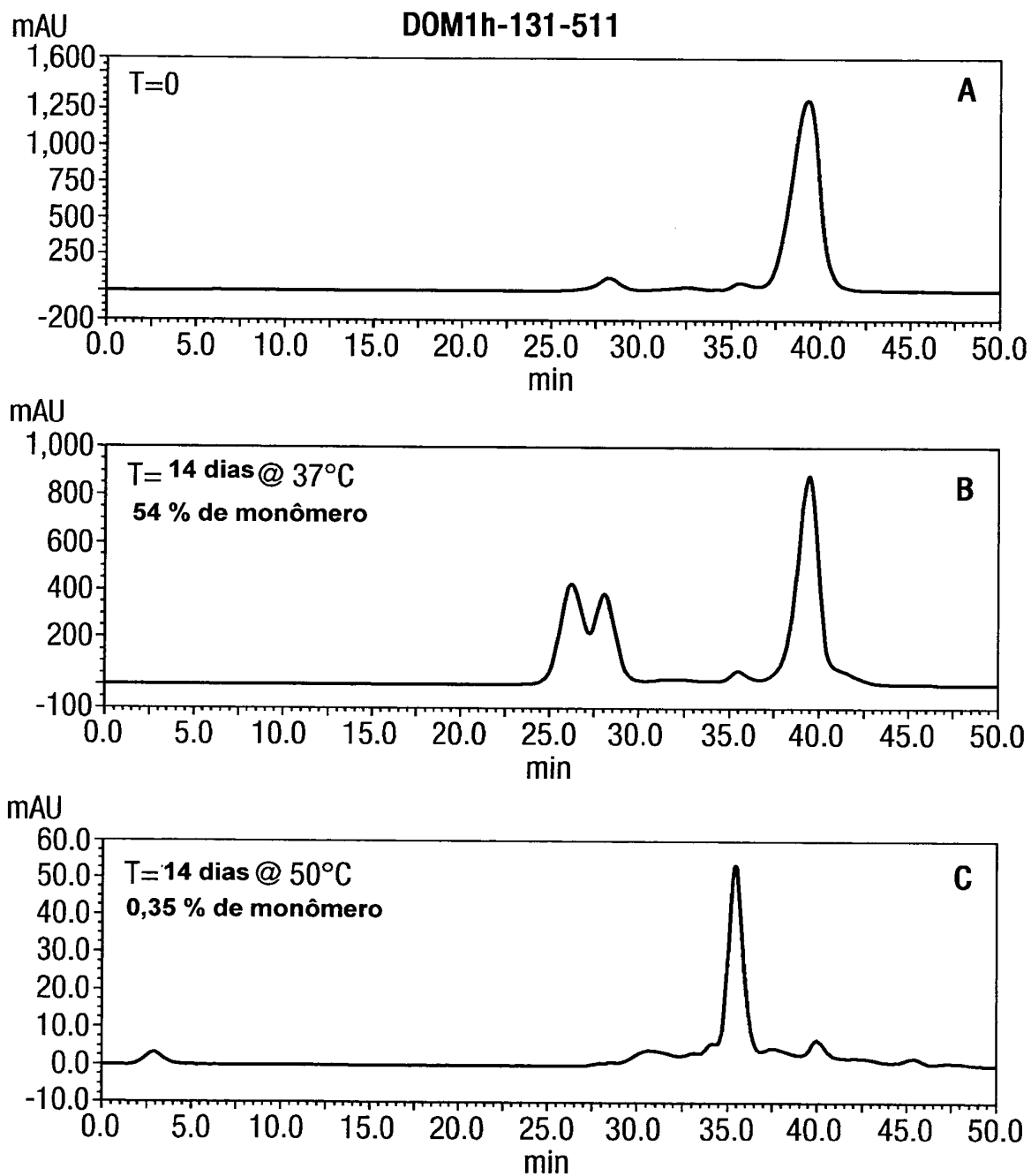


Fig.26 (Cont I).

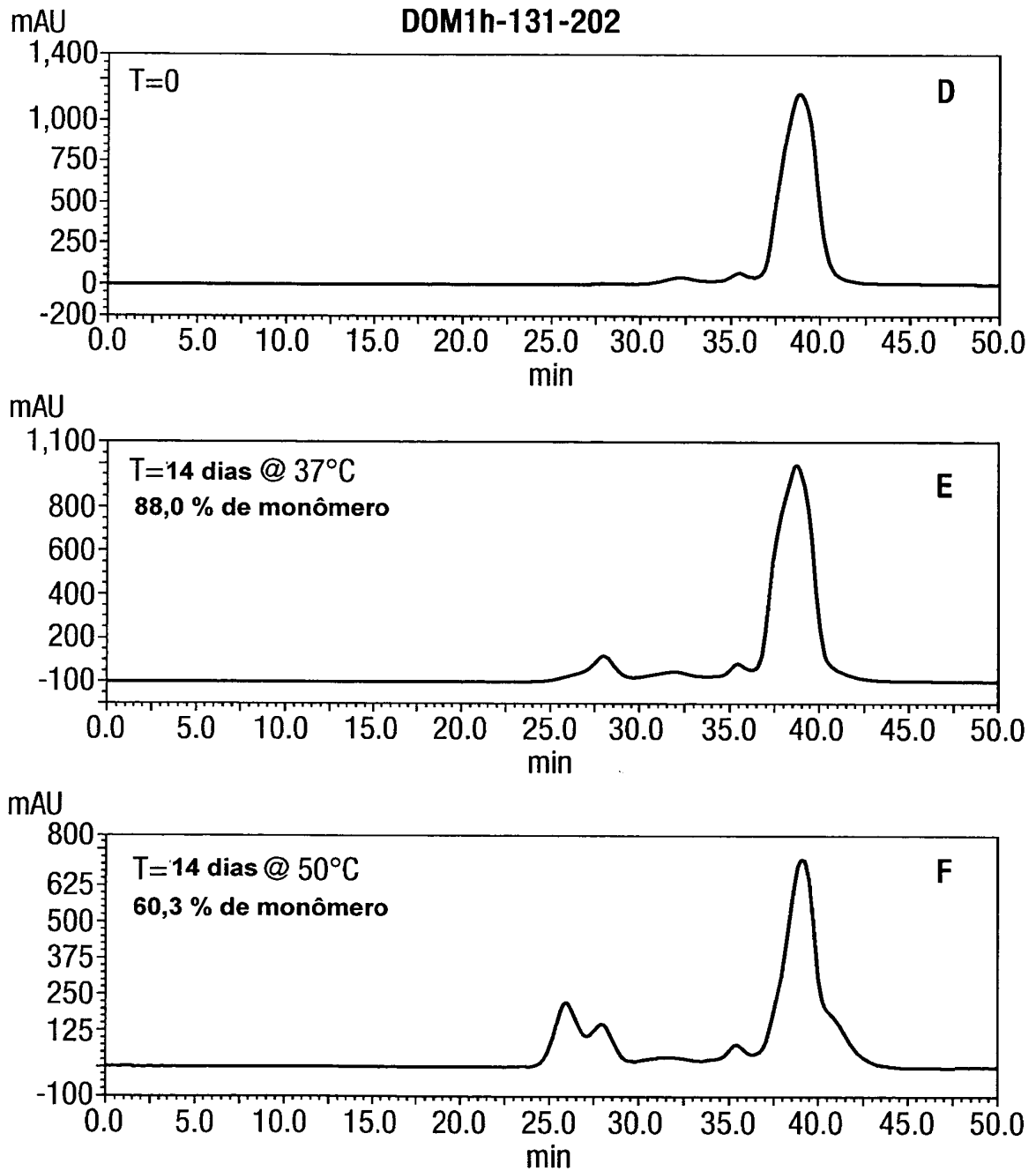


Fig.26 (Cont II).

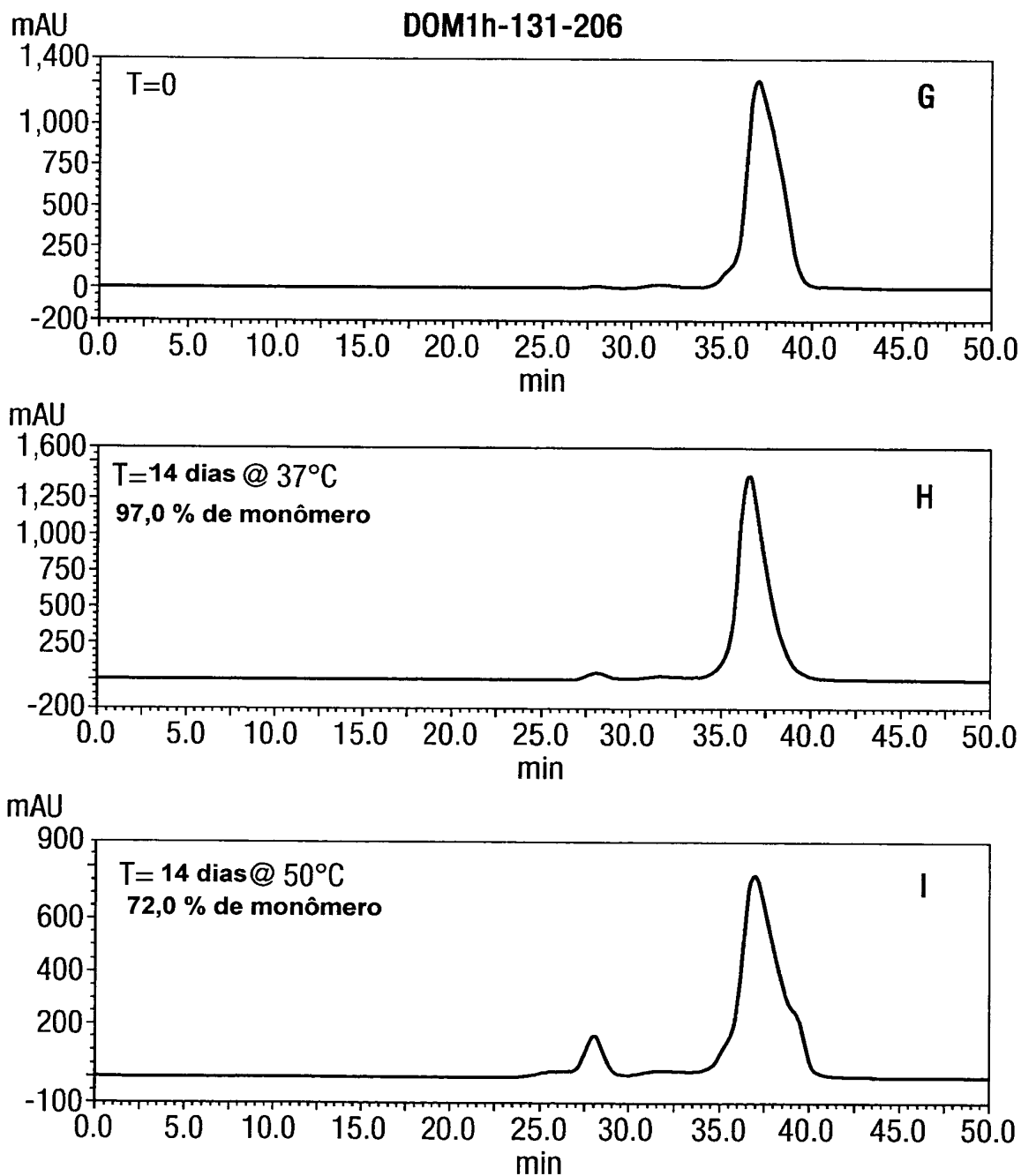


Fig.27.

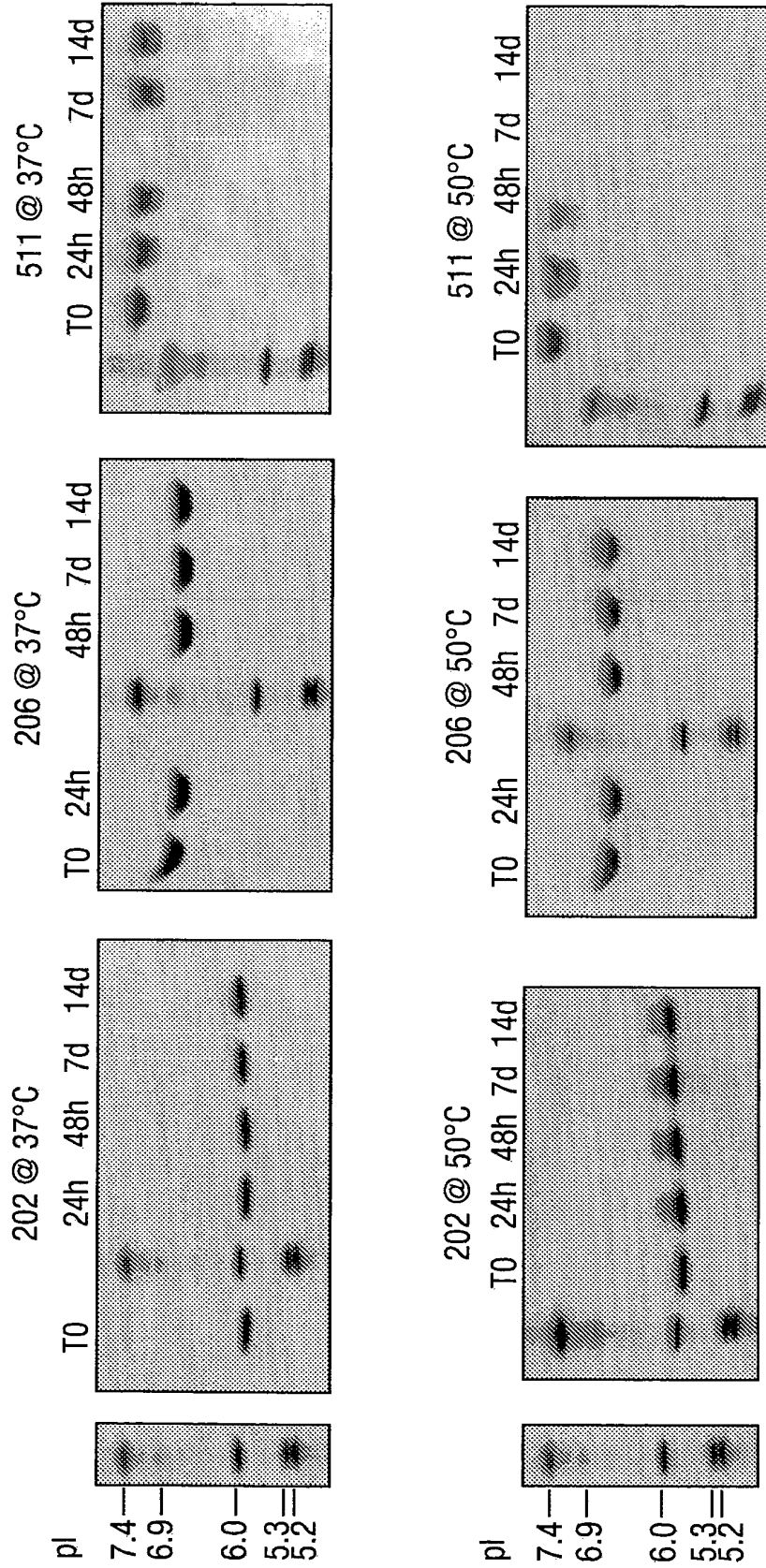
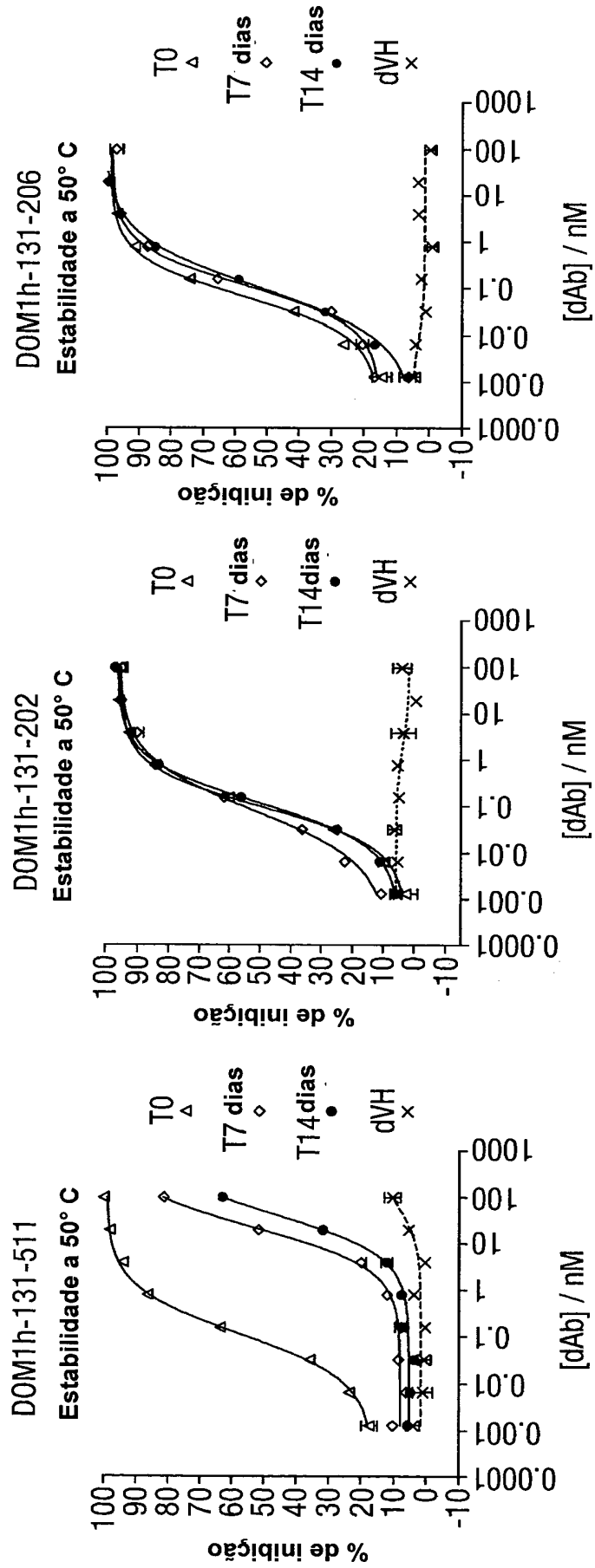


Fig.28.



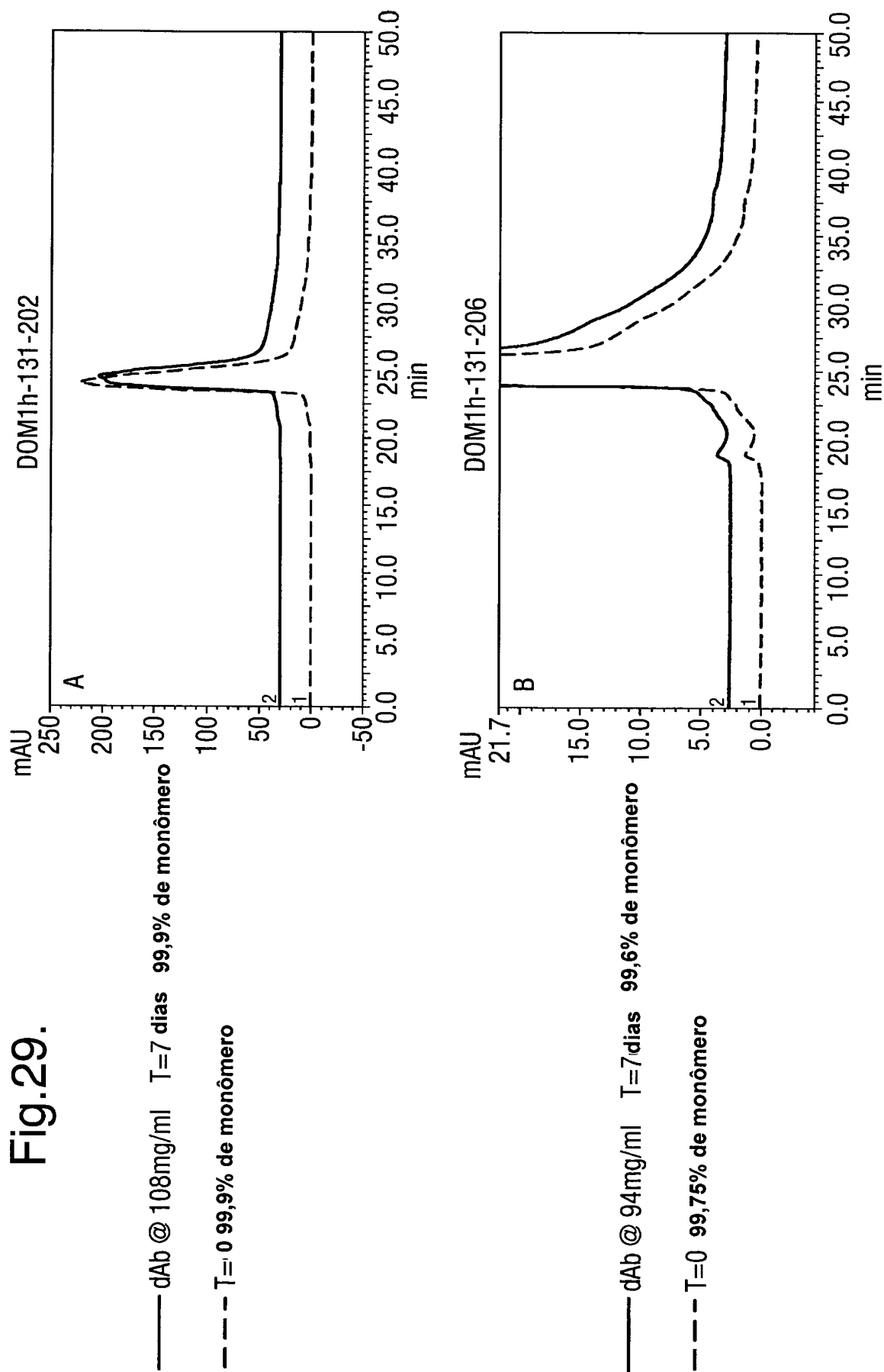


Fig.29 (Cont).

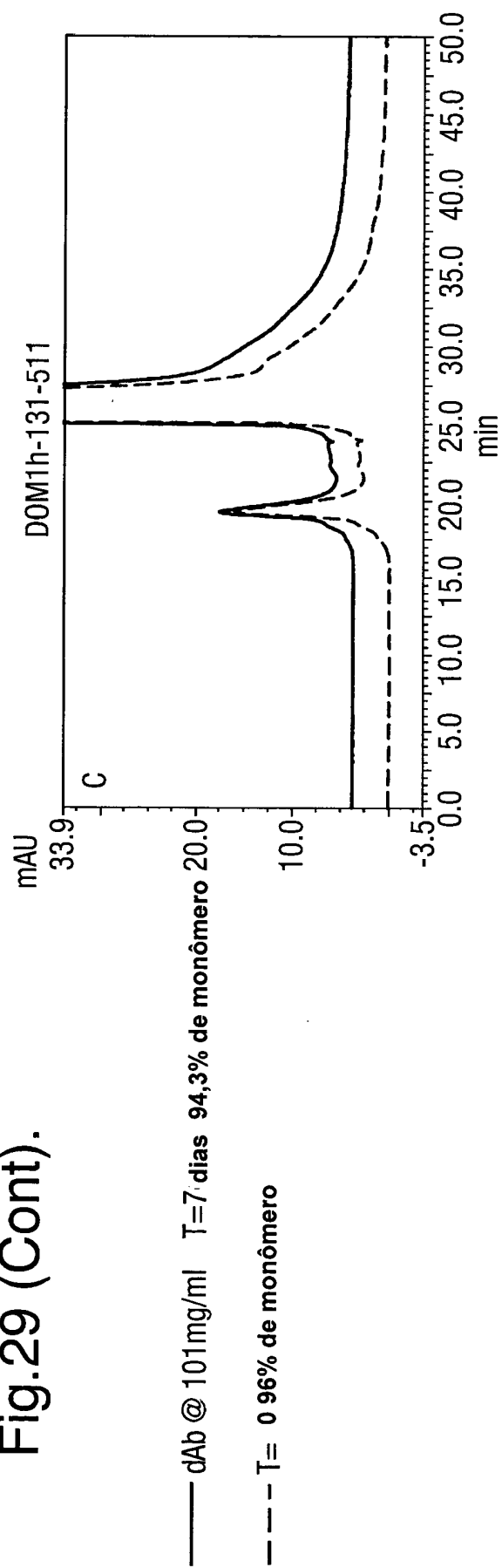


Fig.30.

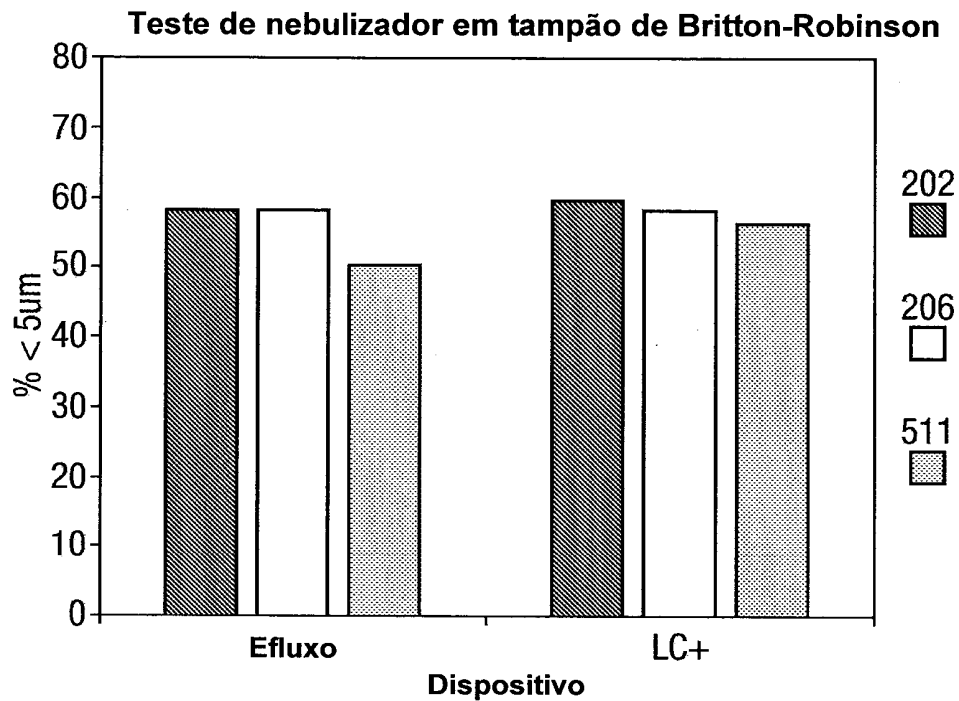


Fig.31.

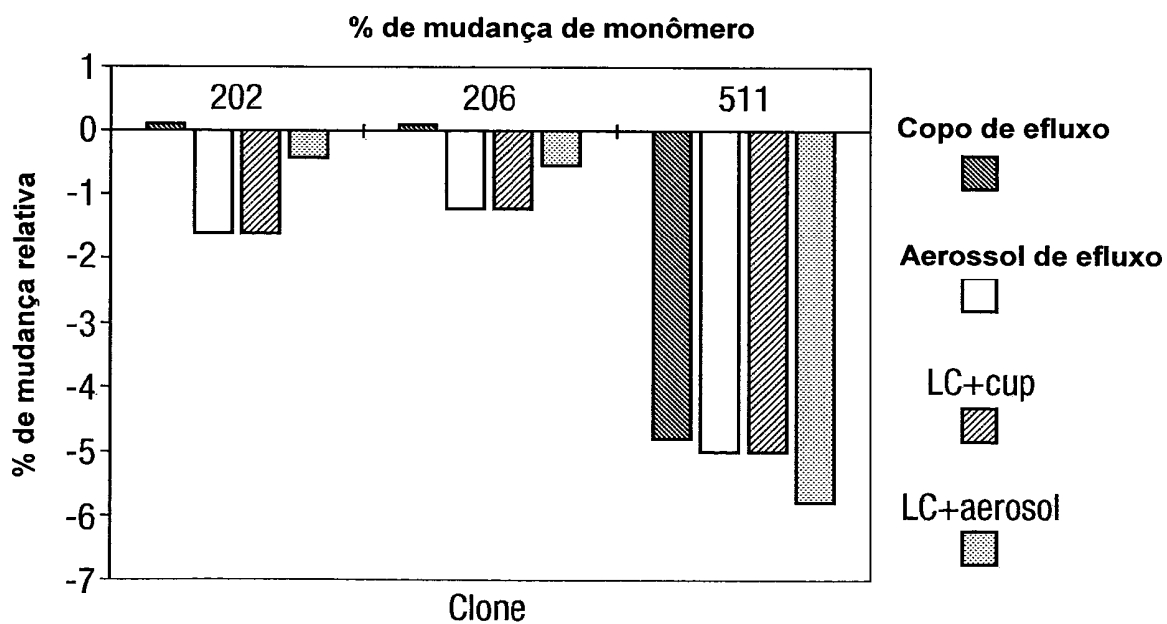


Fig.32.

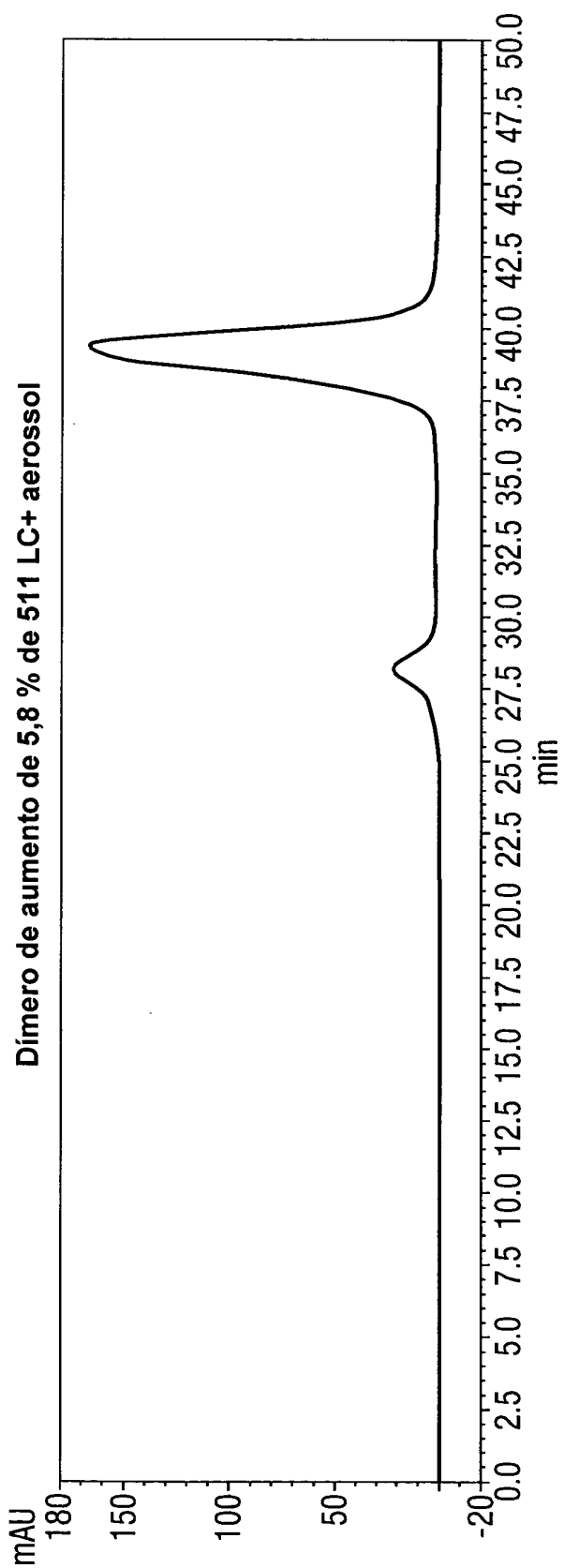
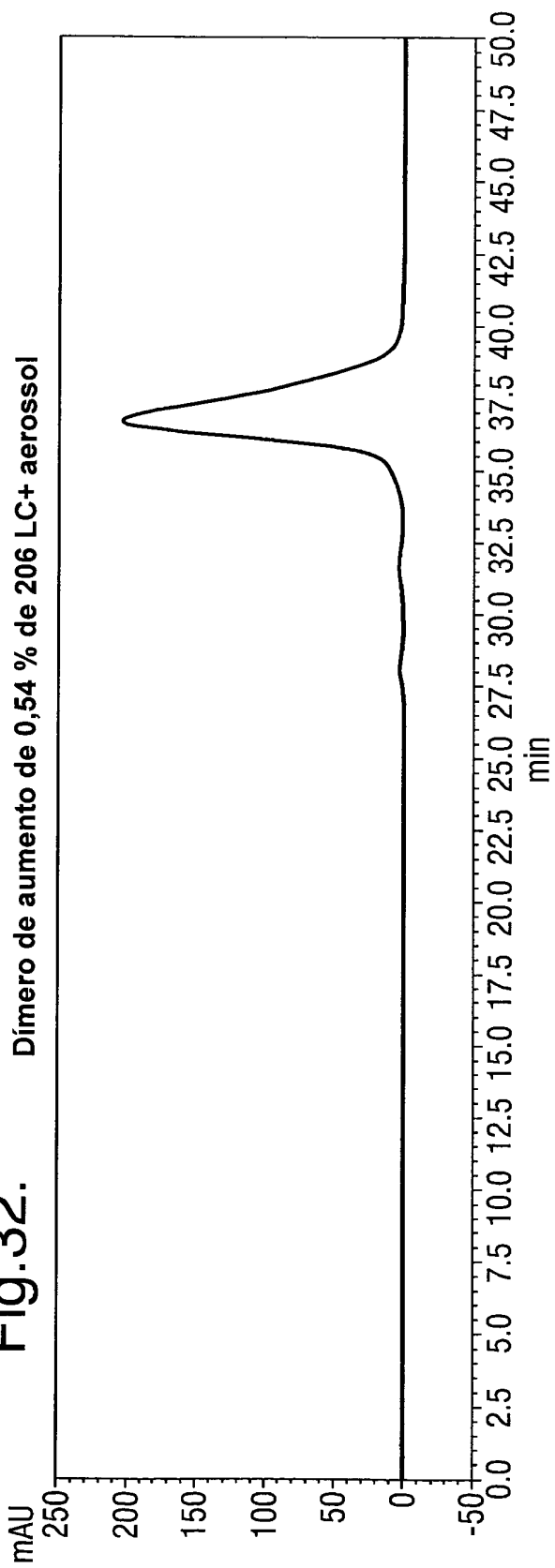


Fig.33.

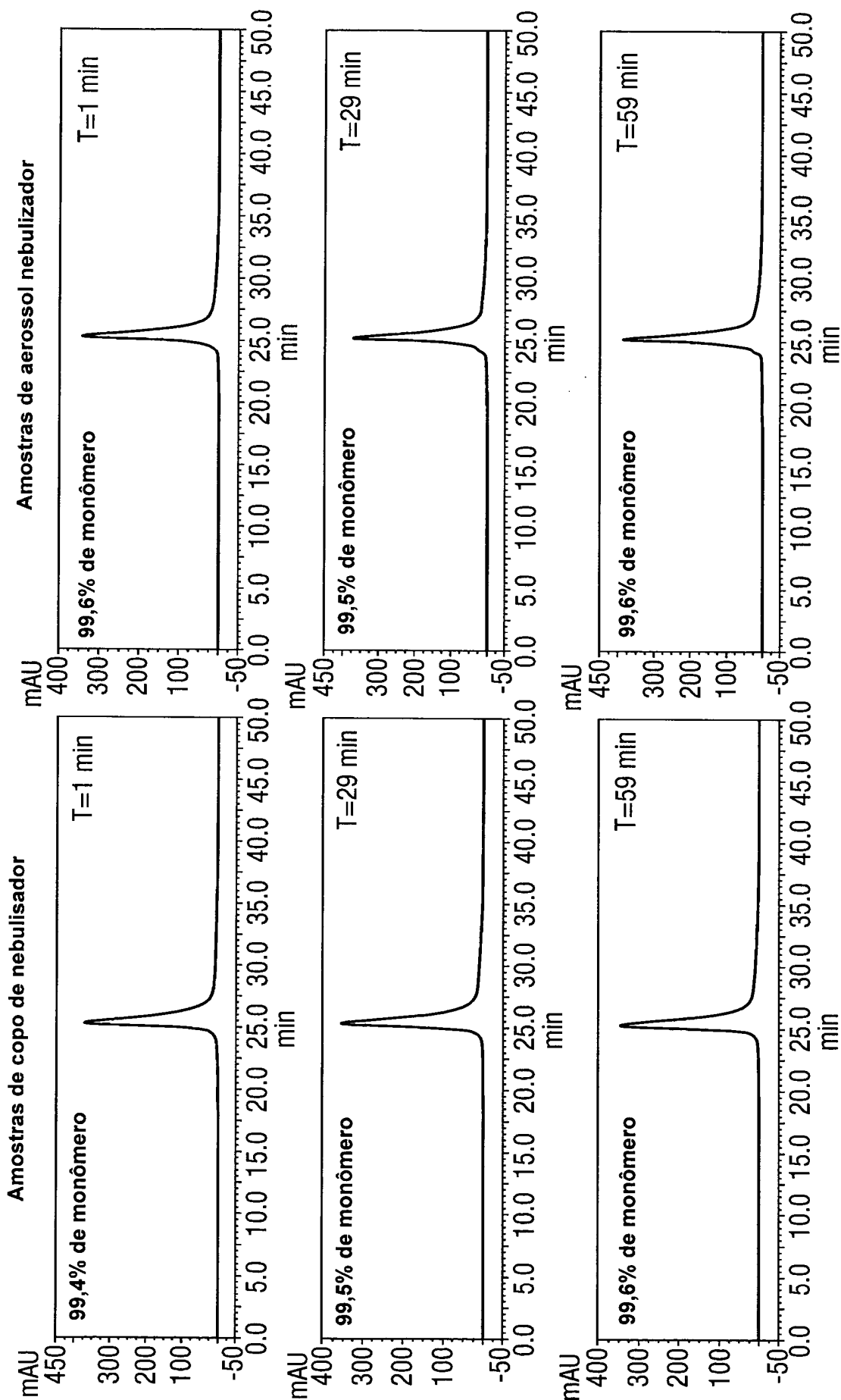


Fig.34.

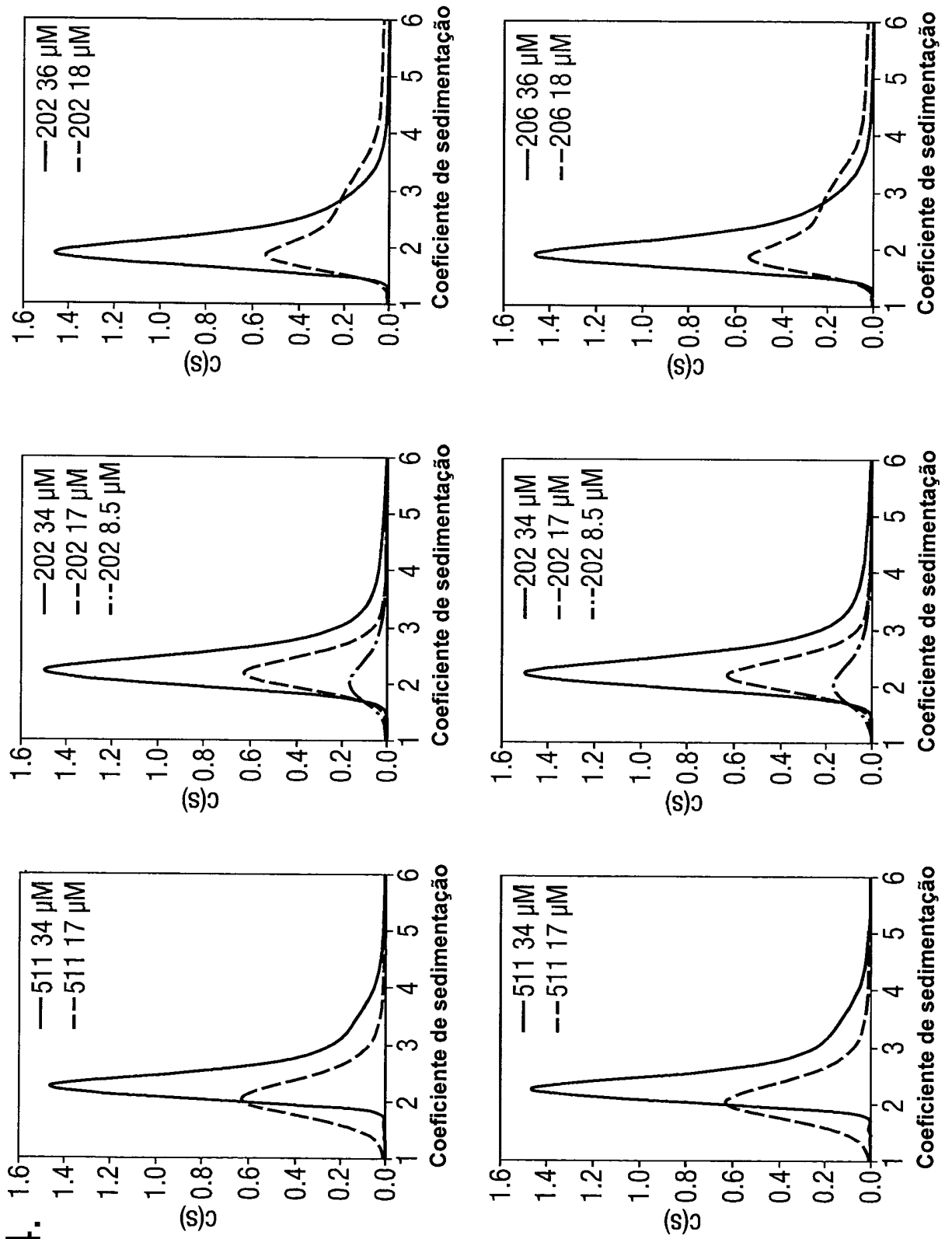


Fig.35.

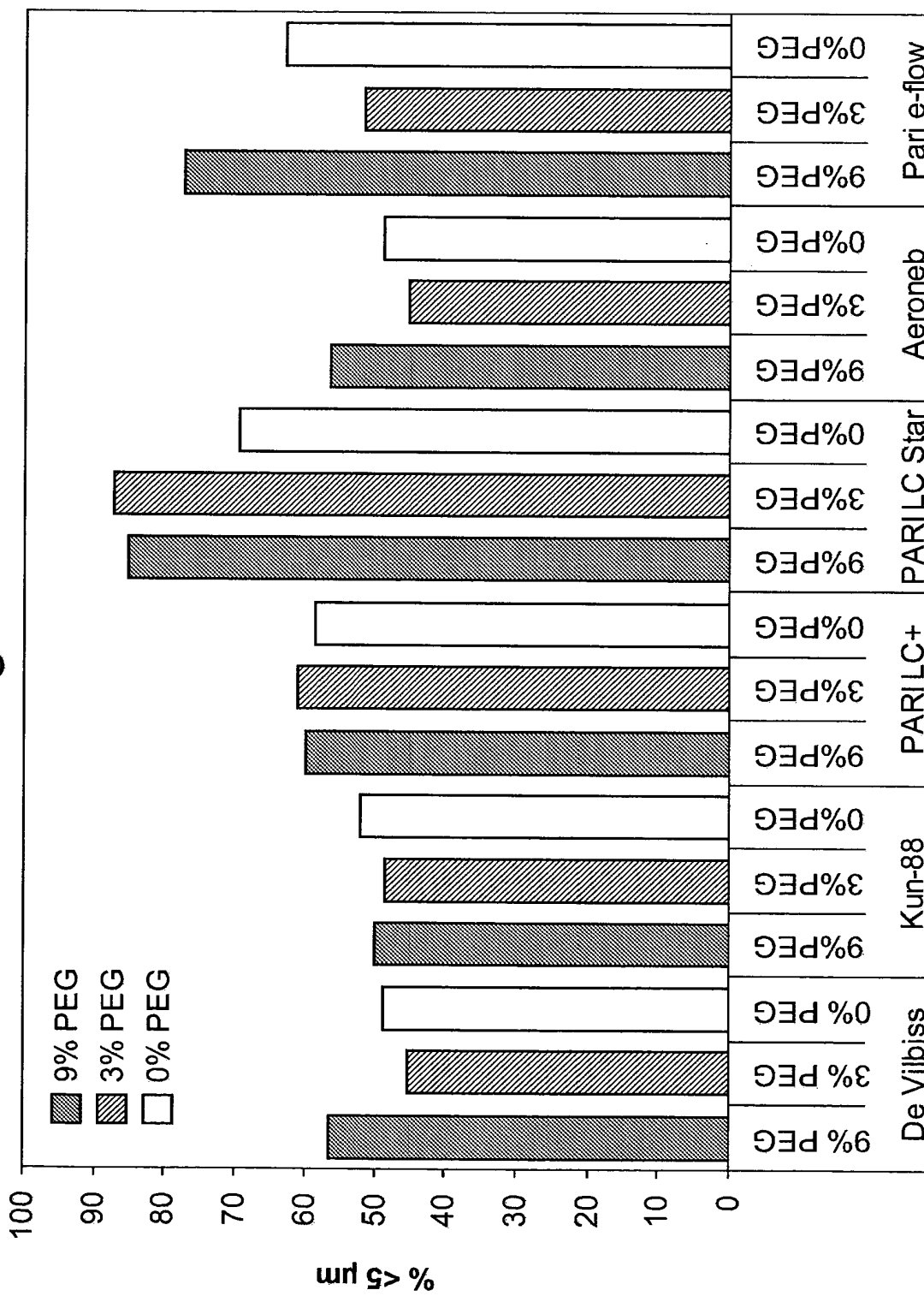


Fig.36.

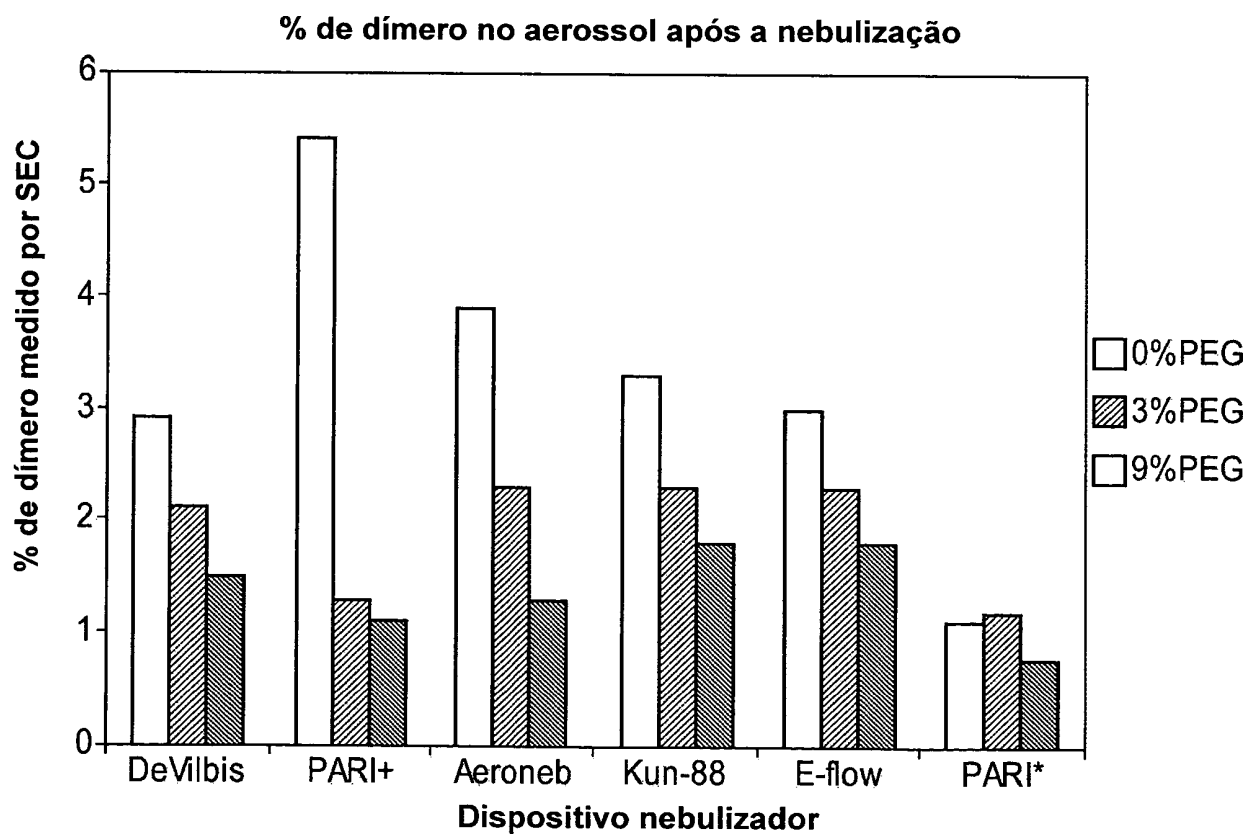
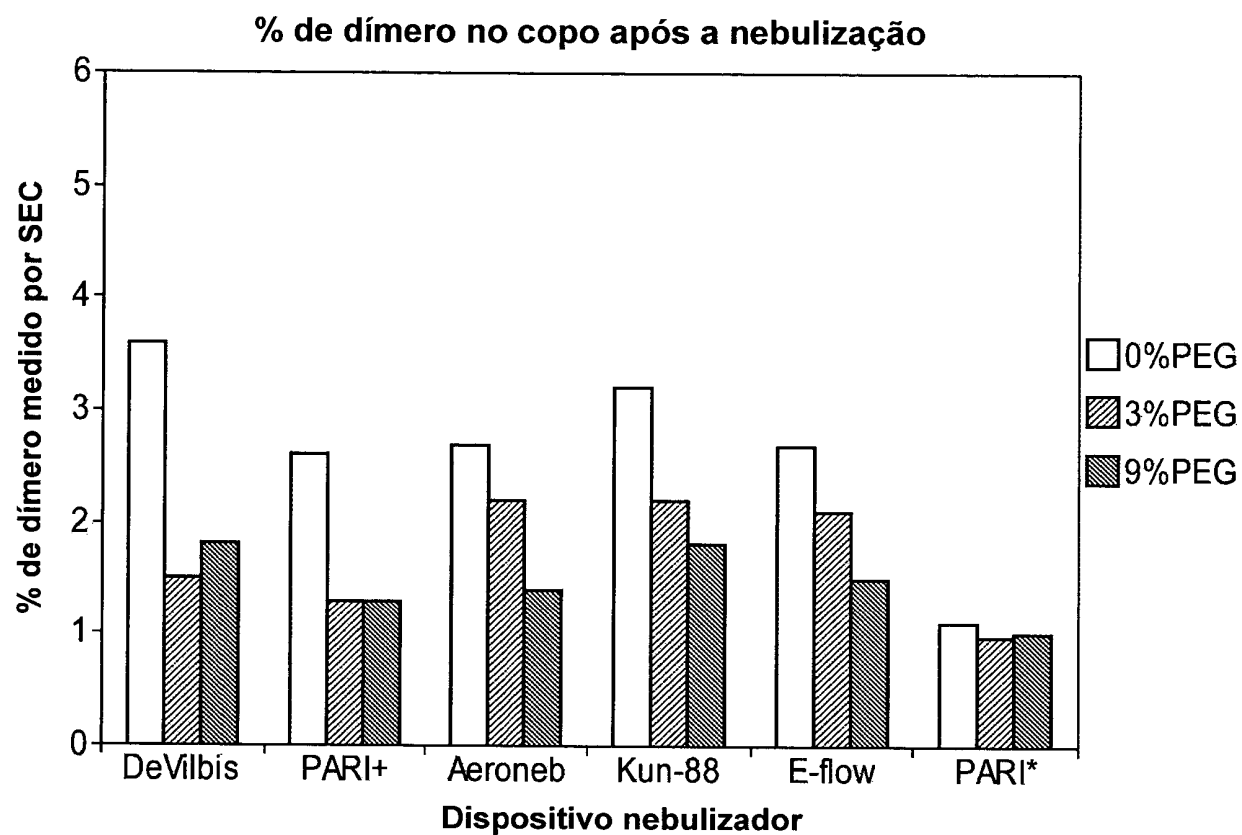


Fig.37.

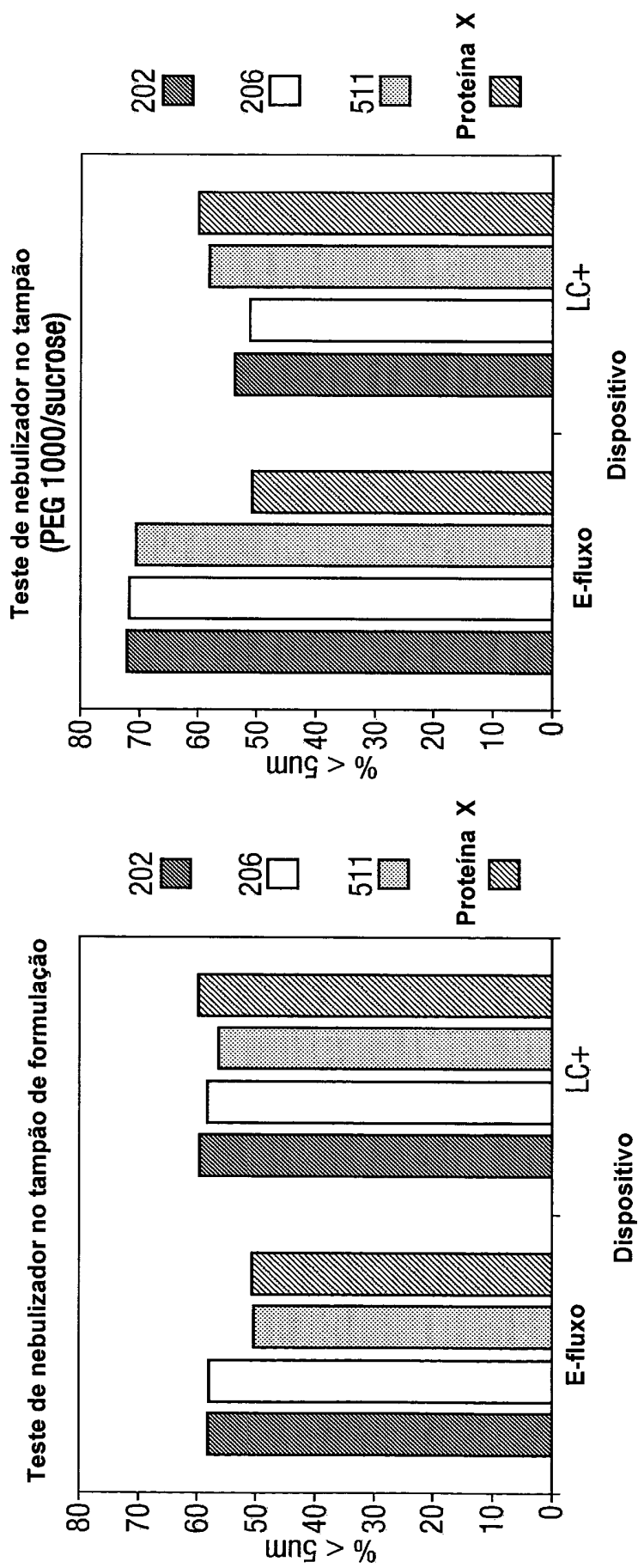


Fig.38.

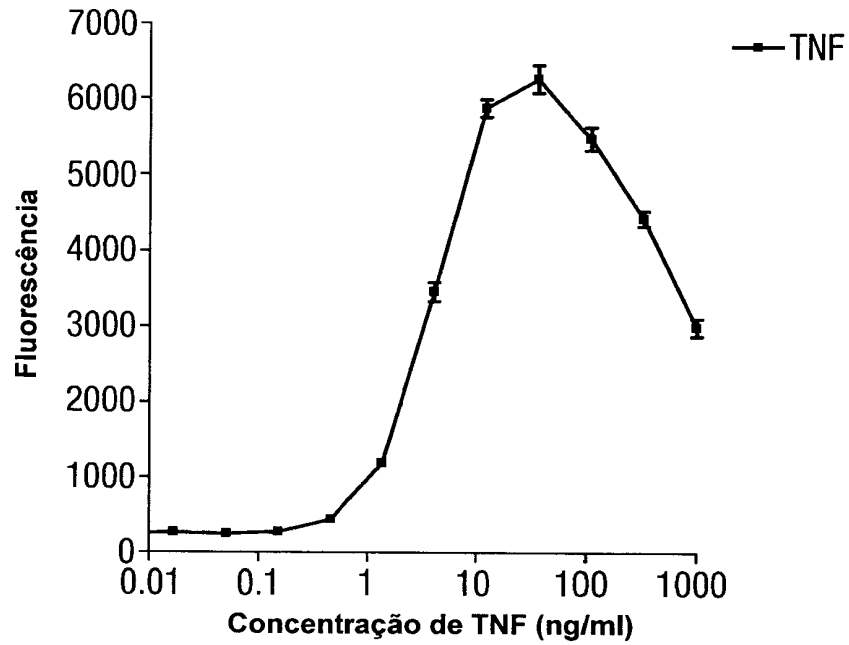


Fig.39.

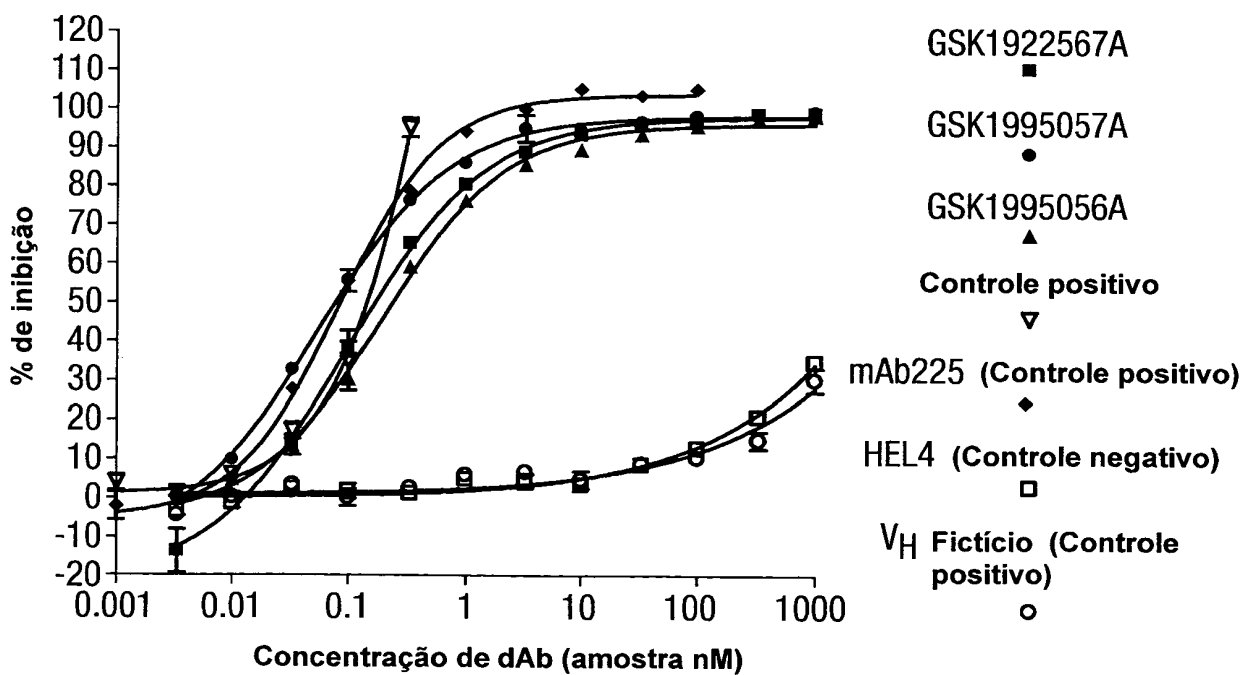


Fig.40.

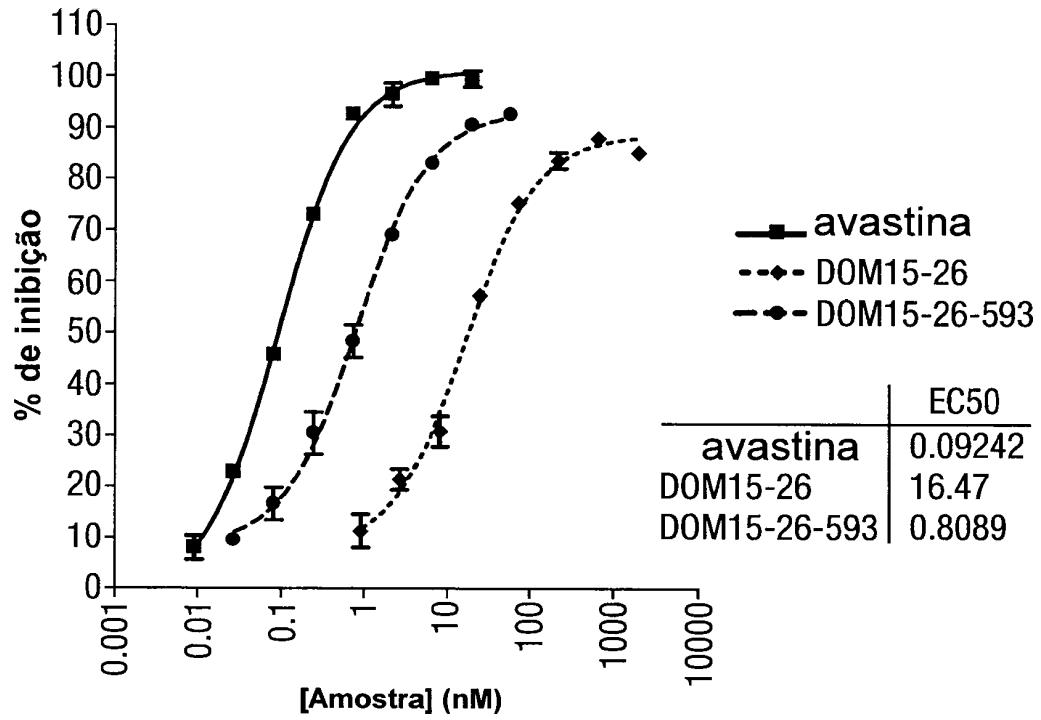


Fig.41.

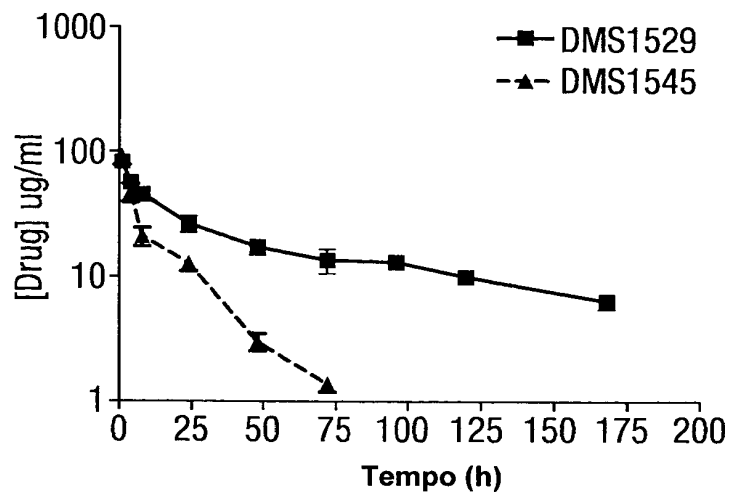


Fig.42a.

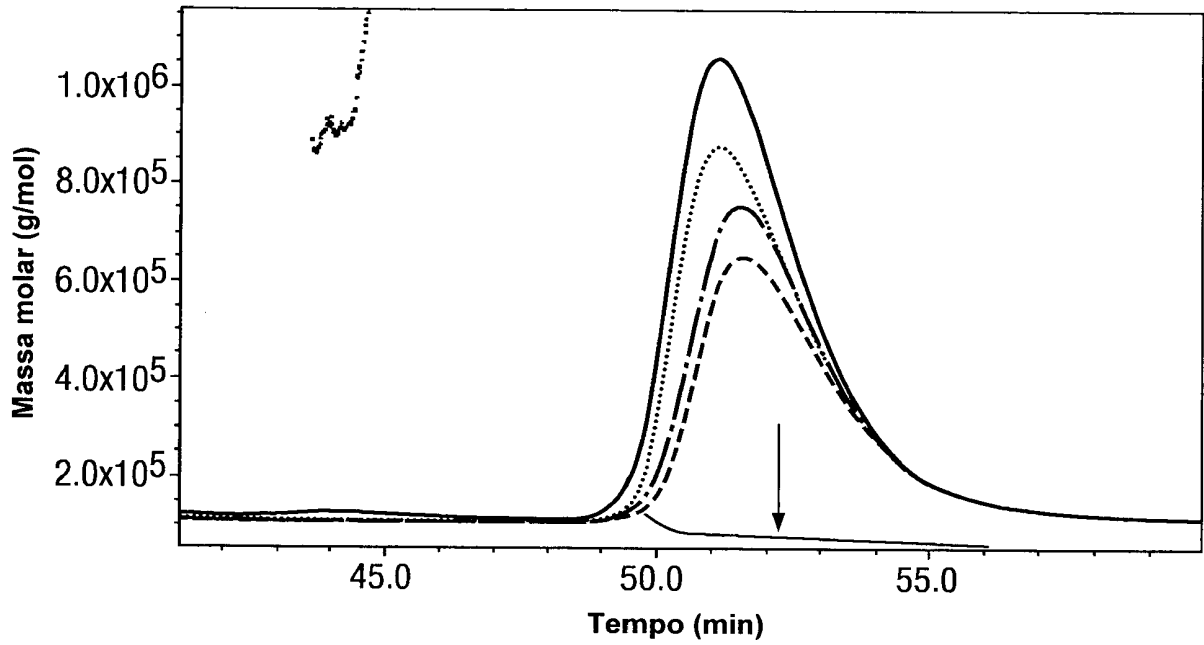


Fig.42b.

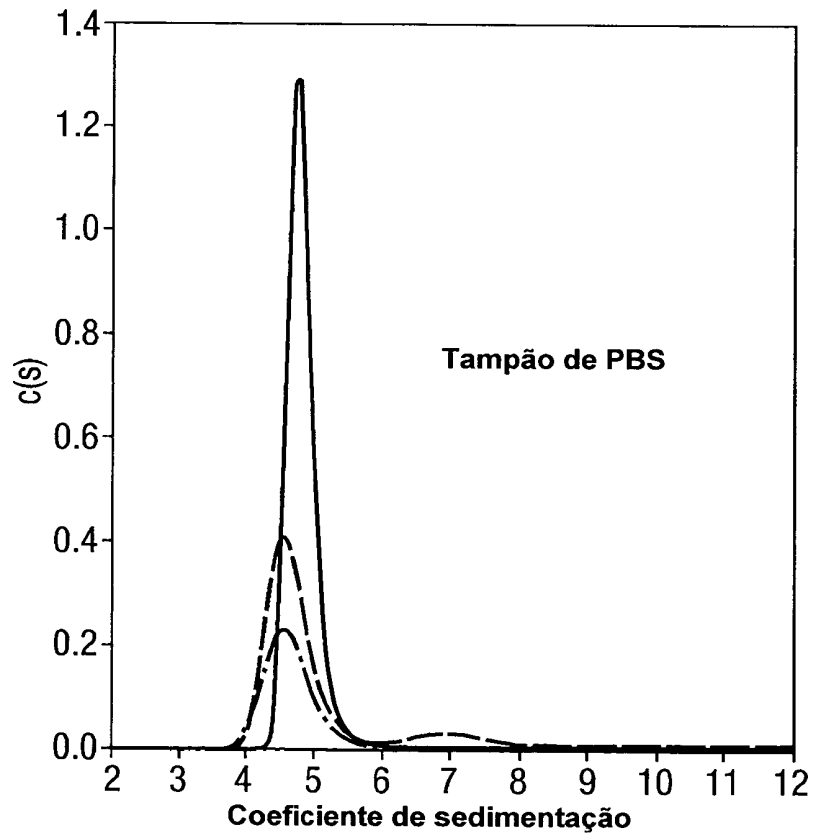


Fig.43.

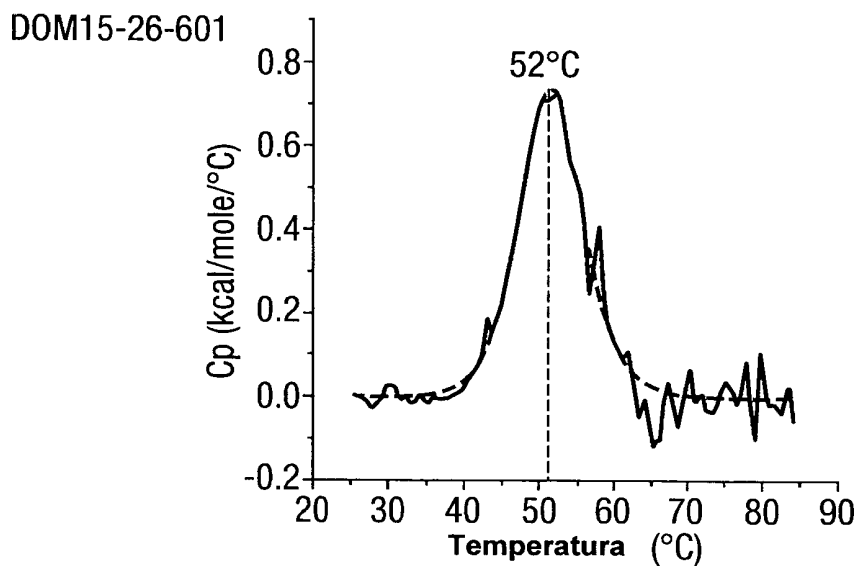
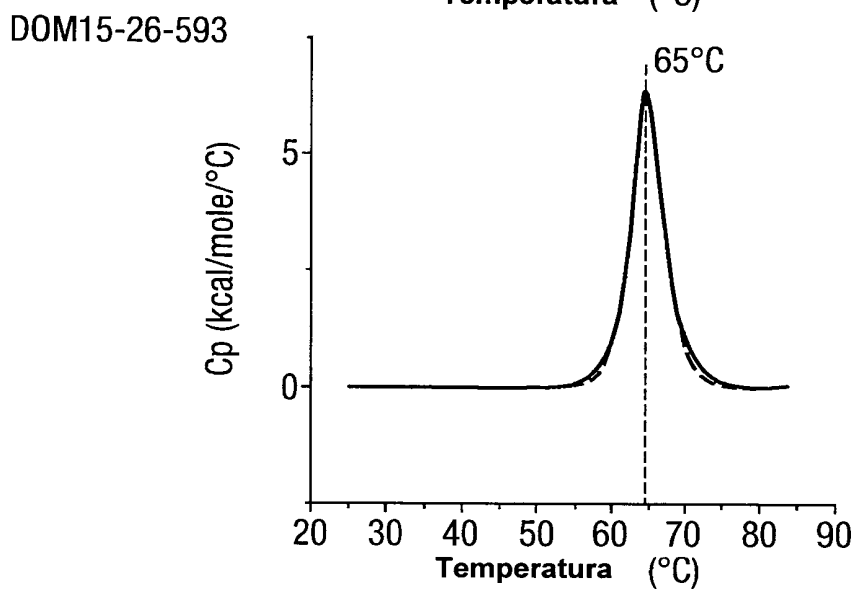
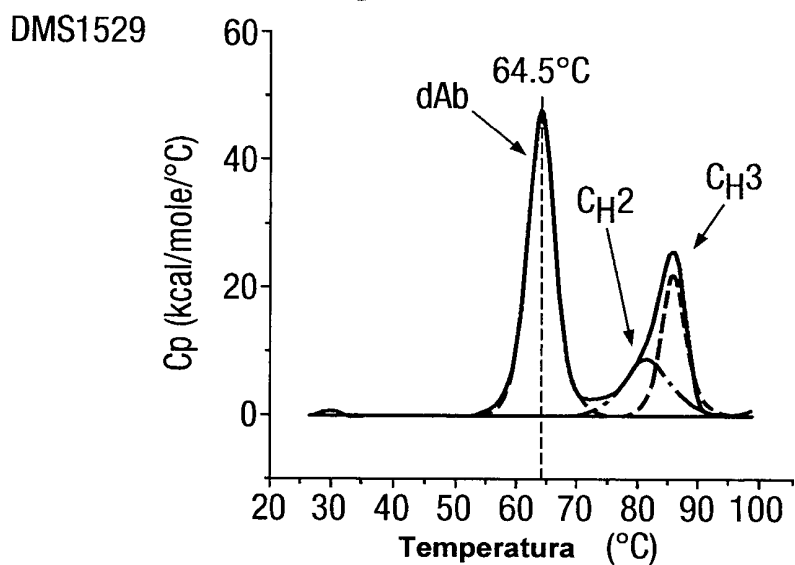
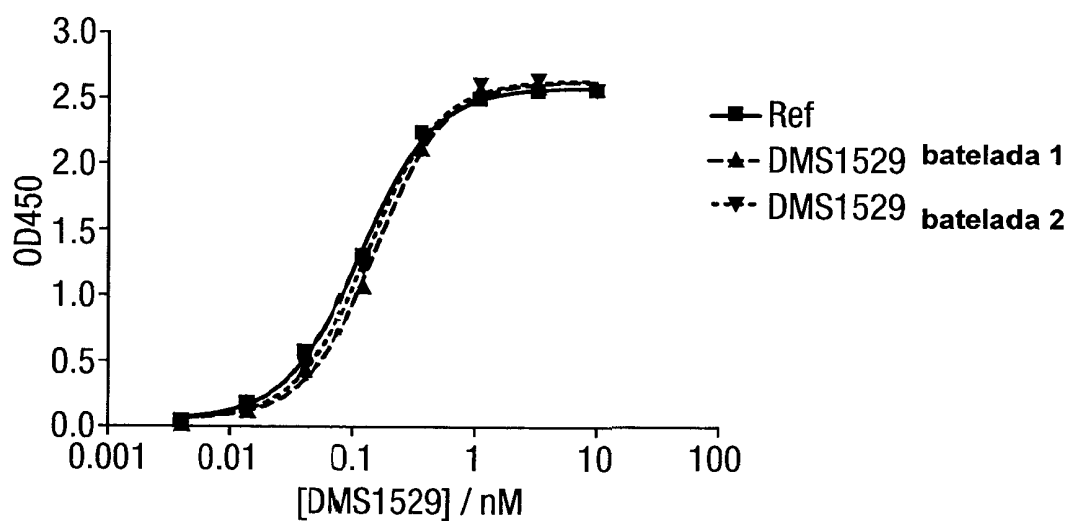


Fig.44.



	Ref	DMS1529 batelada 1	DMS1529 batelada 2
EC50	0.1167	0.1539	0.1358

Fig.45.

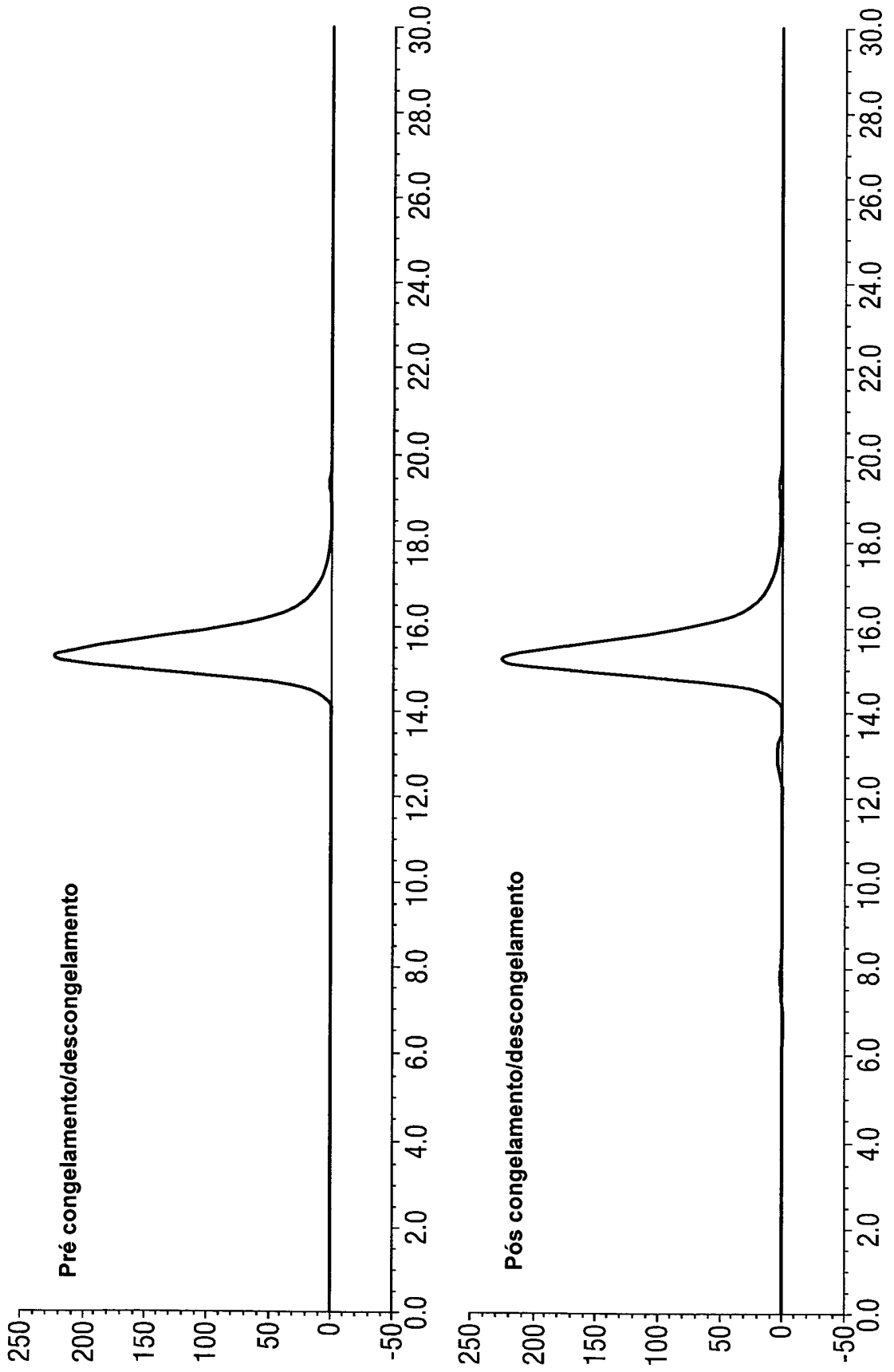
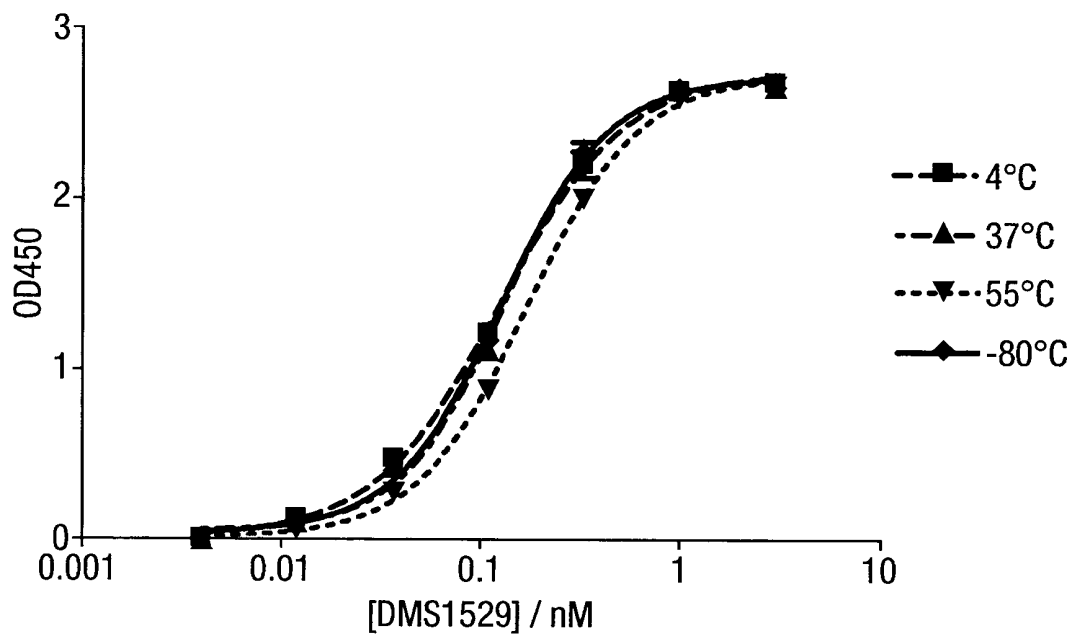
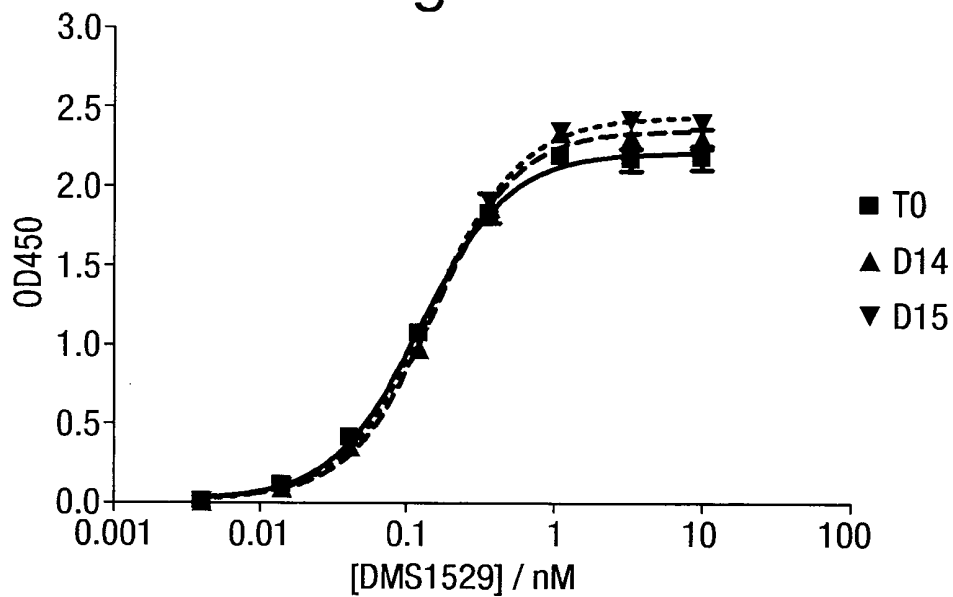


Fig.46.



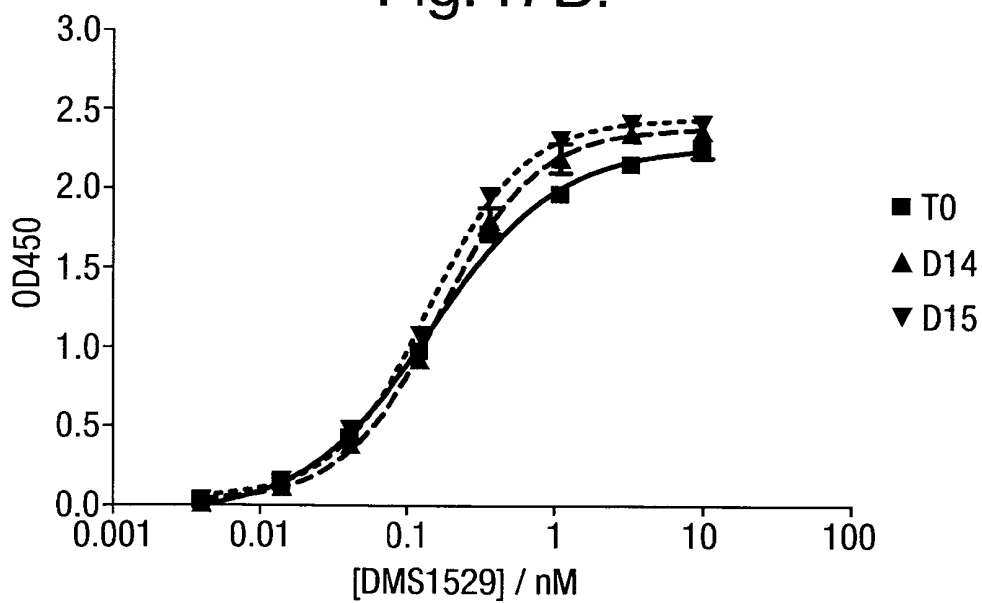
	4°C	37°C	55°C	-80°C
EC50	0.1269	0.1334	0.1748	0.1288

Fig.47A.



	T0	D14	D15
EC50	0.1253	0.1520	0.1495

Fig.47B.



	T0	D14	D15
EC50	0.1453	0.1681	0.1422

Fig.48.

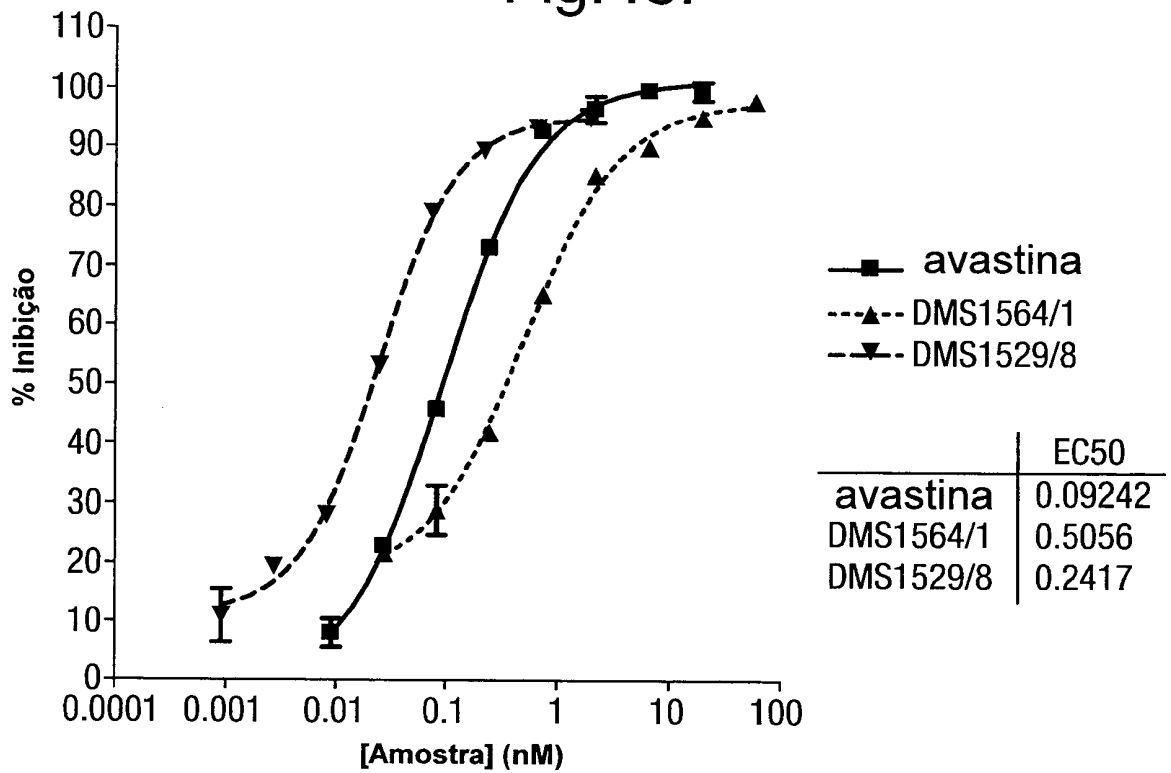
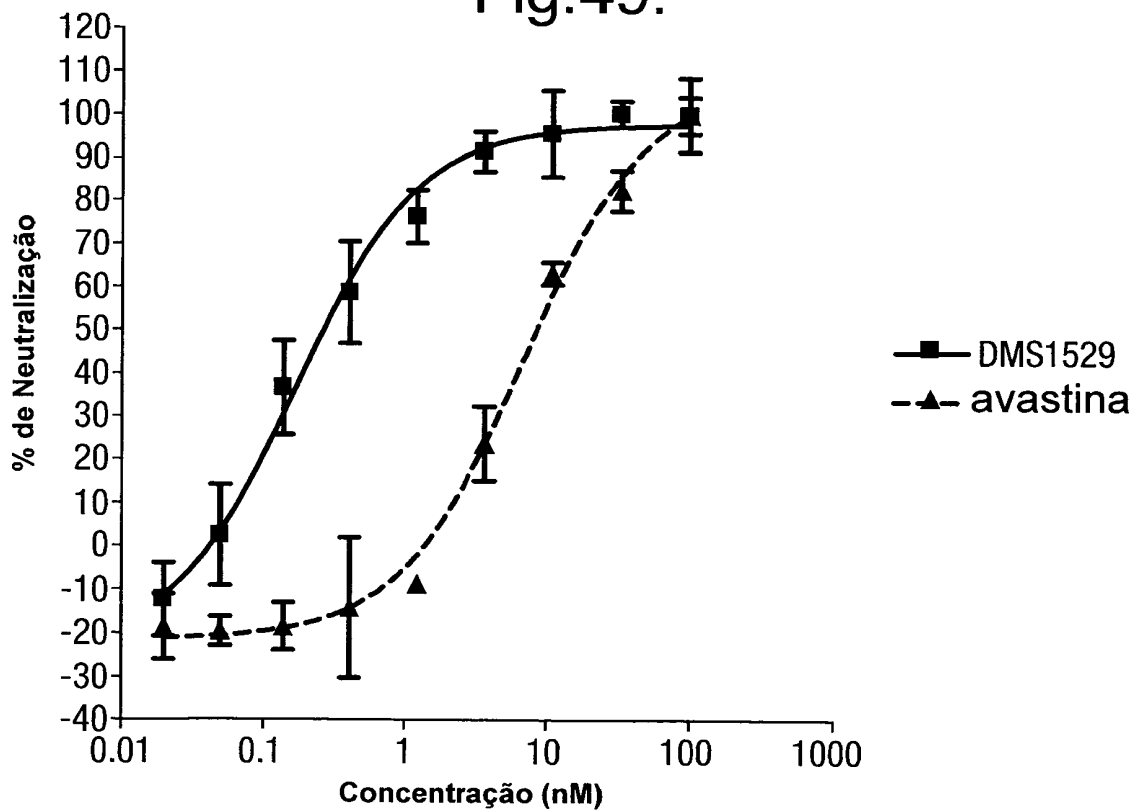


Fig.49.



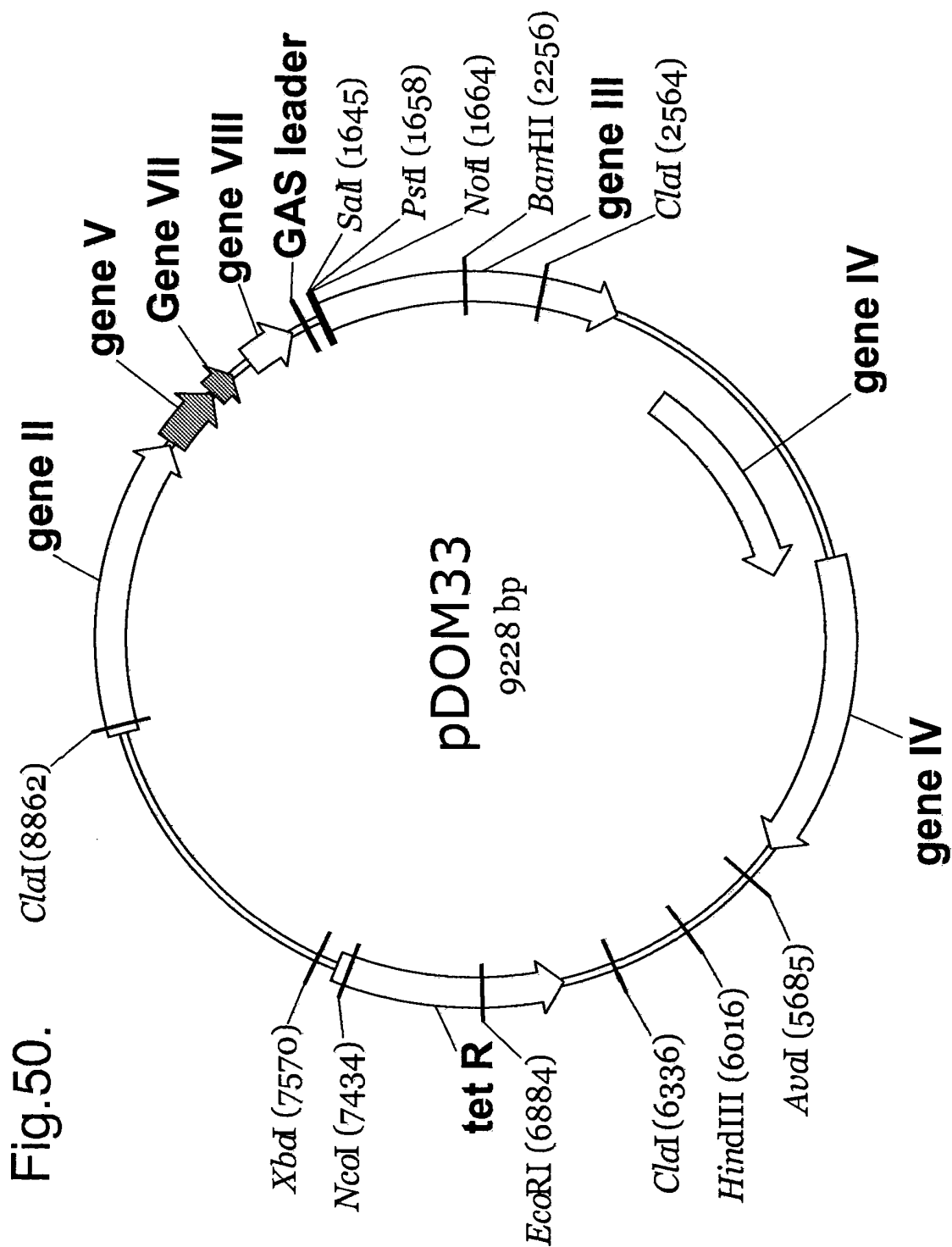


Fig.50.

Fig.51a.

numeração de Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7h-1	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-10	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-11	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-12	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-13	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-14	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-2	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-3	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-4	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-5	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-6	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-7	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-8	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-9	D I Q M T Q Q P F S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						

numeração de Kabat	40	45	50	55	60	65	70
DOM7h-1	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-10	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-11	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-12	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-13	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-14	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-2	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-3	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-4	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-5	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-6	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-7	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-8	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						
DOM7h-9	F Q Q K P Q K A F K L L I Y R H S F L Q S G V F S R F S S S G S G T D						

numeração de Kabat	75	80	85	90	95	100	105
DOM7h-1	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-10	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-11	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-12	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-13	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-14	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-2	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-3	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-4	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-5	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-6	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-7	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-8	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						
DOM7h-9	F T L T I S S L Q F E D F A T Y T C Q Q T T L V F P T F Q Q G T E V E						

numeração de Kabat	110
DOM7h-1	I X R
DOM7h-10	I X R
DOM7h-11	I X R
DOM7h-12	I X R
DOM7h-13	I X R
DOM7h-14	I X R
DOM7h-2	I X R
DOM7h-3	I X R
DOM7h-4	I X R
DOM7h-5	I X R
DOM7h-6	I X R
DOM7h-7	I X R
DOM7h-8	I X R
DOM7h-9	I X R

Fig.51a (Cont I).

numeração de Kabat	5	10	15	20	25	30	35																													
<u>DOM7m-12</u>	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	F	R	H	L	K	W	
<u>DOM7m-16</u>	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	I	F	R	H	L	K	W
<u>DOM7m-26</u>	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	Y	I	H	L	K	W	
numeração de Kabat	40	45	50	55	60	65	70																													
<u>DOM7m-12</u>	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	
<u>DOM7m-16</u>	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	
<u>DOM7m-26</u>	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	
numeração de Kabat	75	80	85	90	95	100	105																													
<u>DOM7m-12</u>	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	V	A	L	Y	P	K	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	
<u>DOM7m-16</u>	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	A	R	W	P	Q	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	
<u>DOM7m-26</u>	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	V	E	K	V	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	
numeração de Kabat																																				
<u>DOM7m-12</u>	I	K	R																																	
<u>DOM7m-16</u>	I	K	R																																	
<u>DOM7m-26</u>	I	K	R																																	

Fig.51a
(Cont II).

numeração de Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7r-1	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-13	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-14	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-15	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-16	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-17	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-18	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-19	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-3	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-4	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-7	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-5	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						
DOM7r-8	D I Q M T Q S P F S L S A S Y G D R V T I T C R A S Q V I G R I L E W						

numeração de Kabat	40	45	50	55	60	65	70
DOM7r-1	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-13	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-14	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-15	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-16	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-17	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-18	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-19	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-3	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-4	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-7	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-5	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						
DOM7r-8	Y Q Q K F G K A F K L L I Y D S S V L Q S G V F S R P F G S G S Q T D						

numeração de Kabat	75	80	85	90	95	100	105
DOM7r-1	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-13	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-14	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-15	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-16	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-17	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-18	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-19	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-3	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-4	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-7	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-5	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						
DOM7r-8	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q G R Y K F Y T T F G Q G T K V E						

numeração de Kabat	
DOM7r-1	XXX
DOM7r-13	XXX
DOM7r-14	XXX
DOM7r-15	XXX
DOM7r-16	XXX
DOM7r-17	XXX
DOM7r-18	XXX
DOM7r-19	XXX
DOM7r-3	XXX
DOM7r-4	XXX
DOM7r-7	XXX
DOM7r-5	XXX
DOM7r-8	XXX

Fig.51a (Cont III).

numeração de Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7h-23	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GPTE F	Y DYNM S
DOM7h-21	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GPTE F	D LYDM S
DOM7h-22	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GPTE F	S KYWM S
DOM7h-24	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GPTE F	H RYSM S
DOM7h-25	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GPTE F	W KYNM A
DOM7h-26	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCTA S	GPTE F	D ERYM S
DOM7h-27	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GPTE F	S DYRM S
DOM7h-30	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GPTE F	R TYTM A
DOM7h-31	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GPTE F	R PTNM S
numeração de Kabat	40	45	50	54	59	64	69
DOM7h-23	NVRQ	A PGGK L	EWVS T	ITHT G	GVTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7h-21	NVRQ	A PGGK L	EWVS S	IVNS G	VRTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7h-22	NVRQ	A PGGK L	EWVS S	IDFM G	PHTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7h-24	NVRQ	A PGGK L	EWVS T	ILPG G	DVTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7h-25	NVRQ	A PGGK L	EWVS T	ILGE G	MNTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7h-26	NVRQ	A PGGK L	EWVS T	ILPH G	DRTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7h-27	NVRQ	A PGGK L	EWVS T	ITSN G	KPTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7h-30	NVRQ	A PGGK L	EWVS S	ITSS G	SESTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7h-31	NVRQ	A PGGK L	EWVS T	ITGT G	AATY Y	ADSV K	GRFT I
numeração de Kabat	74	79	82b	86	91	96	100a
DOM7h-23	SRDN	S KNIL Y	LQMN S	LRAE D	TAVY Y	CAKQ N	PSYQ -
DOM7h-21	SRDN	S KNIL Y	LQMN S	LRAE D	TAVY Y	CAKL N	QSYH W
DOM7h-22	SRDN	S KNIL Y	LQMN S	LRAE D	TAVY Y	CAKGB T	SML P
DOM7h-24	SRDN	S KNIL Y	LQMN S	LRAE D	TAVY Y	CAKQ T	PDYM -
DOM7h-25	SRDN	S KNIL Y	LQMN S	LRAE D	TAVY Y	CAKI M	DYK -
DOM7h-26	SRDN	S KNIL Y	LQMN S	LRAE D	TAVY Y	CAKQ D	PLYR -
DOM7h-27	SRDN	S KNIL Y	LQMN S	LRAE D	TAVY Y	CAKQ D	WYM -
DOM7h-30	SRDN	S KNIL Y	LQMN S	LRAE D	TAVY Y	CAKV N	SLYK -
DOM7h-31	SRDN	S KNIL Y	LQMN S	LRAE D	TAVY Y	CAKQ N	SRYR P
numeração de Kabat	100c	105	110				
DOM7h-23	- - - -	F DYWG Q	GTLV T	VSS			
DOM7h-21	D - - -	F DYWG Q	GTLV T	VSS			
DOM7h-22	MKGK	F DYWG Q	GTLV T	VSS			
DOM7h-24	- - - -	F DYWG Q	GTLV T	VSS			
DOM7h-25	- - - -	F DYWG Q	GTLV T	VSS			
DOM7h-26	- - - -	F DYWG Q	GTLV T	VSS			
DOM7h-27	- - - -	F DYWG Q	GTLV T	VSS			
DOM7h-30	- - - -	F DYWG Q	GTLV T	VSS			
DOM7h-31	- - - -	D YWQQ G	TLVT V	SSK			

Fig.51a (Cont IV).

numeração de Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7r-20	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GFTF W	PYTM S
DOM7r-27	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GFTF W	PYTM S
DOM7r-28	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GFTF H	AYQM A
DOM7r-21	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GFTF W	PYTM S
DOM7r-25	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GFTF W	PYTM S
DOM7r-22	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GFTF W	PYTM S
DOM7r-23	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GFTF W	PYTM S
DOM7r-24	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GFTF W	PYTM S
DOM7r-26	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GFTF W	PYTM S
DOM7r-29	EVQL	L E SGG G	LVQP G	GSLR L	SCAA S	GFTF K	DTDM T
numeração de Kabat	40	45	50	54	59	64	69
DOM7r-20	WVRC	A PGRG L	EWVS T	ISPPG	STTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7r-27	WVRC	A PGRG L	EWVS T	ISPPG	STTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7r-28	WVRC	A PGRG L	EWVS T	IRQTG	FTTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7r-21	WVRC	A PGRG L	EWVS T	ISPPG	STTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7r-25	WVRC	A PGRG L	EWVS T	ISPPG	STTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7r-22	WVRC	A PGRG L	EWVS T	ISPPG	STTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7r-23	WVRC	A PGRG L	EWVS T	ISPPG	STTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7r-24	WVRC	A PGRG L	EWVS T	ISPPG	STTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7r-26	WVRC	A PGRG L	EWVS T	ISPPG	STTY Y	ADSV K	GRFT I
DOM7r-29	WVRC	A PGRG L	EWVS M	ISSEGL	LWTY Y	ADSV K	GRFT I
numeração de Kabat	74	79	82b	86	91	96	100a
DOM7r-20	SRDN	S KNTL Y	LQMN S	LRABD	TAVY Y	CAKGG	KDF -
DOM7r-27	SRDN	S KNTL Y	LQMN S	LRABD	TAVY Y	CAKRS	DVLKT G
DOM7r-28	SRDN	S KNTL Y	LQMN S	LRABD	TAVY Y	CAKVR	SMRF Y
DOM7r-21	SRDN	S KNTL Y	LQMN S	LRABD	TAVY Y	CAKGN	LDPP -
DOM7r-25	SRDN	S KNTL Y	LQMN S	LRABD	TAVY Y	CAKKT	GPSE F
DOM7r-22	SRDN	S KNTL Y	LQMN S	LRABD	TAVY Y	CAKKL	SNCF -
DOM7r-23	SRDN	S KNTL Y	LQMN S	LRABD	TAVY Y	CAKVV	KDNT F
DOM7r-24	SRDN	S KNTL Y	LQMN S	LRABD	TAVY Y	CAKNT	GGKQ P
DOM7r-26	SRDN	S KNTL Y	LQMN S	LRABD	TAVY Y	CAKRT	ENRS V
DOM7r-29	SRDN	S KNTL Y	LQMN S	LRABD	TAVY Y	CAKGF	RLFP R
numeração de Kabat	100c	105	110				
DOM7r-20	- - - -	D YWQQ G	TLVT V	SSX			
DOM7r-27	LDGF	D YWQQ G	TLVT V	SSX			
DOM7r-28	KE - -	D YWQQ G	TLVT V	SSX			
DOM7r-21	- - - -	D YWQQ G	TLVT V	SSX			
DOM7r-25	- - - -	D YWQQ G	TLVT V	SSX			
DOM7r-22	- - - -	D YWQQ G	TLVT V	SSX			
DOM7r-23	- - - -	D YWQQ G	TLVT V	SSX			
DOM7r-24	- - - -	D YWQQ G	TLVT V	SSX			
DOM7r-26	EF - -	D YWQQ G	TLVT V	SSX			
DOM7r-29	TF - -	D YWQQ G	TLVT V	SSX			

Fig.51a (Cont V).

dAb 2, 4, 7, 41

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYVPPPTFGQGTKVEIKR

dAb 38, 54

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYRIPPTFGQGTKVEIKR

dAb 46, 47, 52, 56

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIKSLKWKYQQKPGKAPKLLIYNASYLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYWPVPTFGQGTKVEIKR

dAb 13, 15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIYHLKWKYQQKPGKAPKLLIYKSTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVRKVPRTFGQGTKVEIKR

dAb 30, 35

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIIRYLKWKYQQKPGKAPKLLIYQASVLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGLYPPITFGQGTKVEIKR

dAb 19,

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIYNWLKWKYQQKPGKAPKLLIYRASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNVVIPRTFGQGTKVEIKR

dAb22

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSILWHLRWYQQKPGKAPKLLIYHASLLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSAVYPKTFGQGTKVEIKR

dAb23

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIYRYLAWYQQKPGKAPKLLIYHASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRLLYPKTFGQGTKVEIKR

dAb24

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIYHLAWYQQKPGKAPKLLIYPASKLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRARWPRTFGQGTKVEIKR

dAb31

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIWHLNWKYQQKPGKAPKLLIYRASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVARVPRTFGQGTKVEIKR

dAb33

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIYRYLRWYQQKPGKAPKLLIYKASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYVGYPRTFGQGTKVEIKR

dAb34

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSILKYLKWKYQQKPGKAPKLLIYNASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTTYYPITFGQGTKVEIKR

dAb53

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSILRYLRWYQQKPGKAPKLLIYKASWLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVLYYPQTFGQGTKVEIKR

dAb11

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSILRSLKWKYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYWPATFGQGTKVEIKR

Fig.51a (Cont VI).

dAb12

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSI FRHLKWKYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVALYPKTFGQGTKVEIKR

dAb17

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSI RKYLRWKYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNLFWRPRTFGQGTKVEIKR

dAb18

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSI RRYLNWKYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQMLFYPKTFGQGTKVEIKR

dAb16, 21

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSI IKHLKWKYQQKPGKAPKLLIYGASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGARWPQTFGQGTKVEIKR

dAb25, 26

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSI IYHLKWKYQQKPGKAPKLLIYKASTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVRKVPRTFGQGTKVEIKR

dAb27

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSI YKHLKWKYQQKPGKAPKLLIYNASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVGRYPKTFGQGTKVEIKR

dAb55

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSI FKSLKWKYQQKPGKAPKLLIYNASYLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVVYWPVTFGQGTKVEIKR

dAb 8, 10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFWVYQMDWVRQAPGKGLEWVSSISAFGAKTL
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKLSGKFDYWGQGLVTVSS

dAb 36

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFW SYQMTWVRQAPGKGLEWVSSISSFGSSTL
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGRDHNYS LFDYWGQGLVTVSS

Fig.51b.

>DOM7h-1

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCTTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCC
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATACTG TTCCTCCTAC GTTTGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACAG

>DOM7h-10

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCACCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCTTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATTCGA TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-11

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCG TCCGATTGGG ACGACGTTAA GTTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTGGTTT GGTTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCGCAG GCTGGGACGC ATCCTACGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-12

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTAA GTATATTGGT TCGCAGTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCGCTTGG GCGTCCGTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCTCAG GGTGCTGCGT CGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-13

GACATTCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTTTATTTAT CGGTATTTAT CGTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGTCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCGTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CATGCTCATT TGCCTCGTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont I).

>DOM7h-14

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG TCTCAGTTAT CTTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCATGTGG CGTTCCTCGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT

GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCTCAG GGTGCGGCGT TGCCTAGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont II).

>DOM7h-2

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTGCT ACTTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG TCTTCCTCTT TGCAAAGCGC GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGTT TTCACACTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATGCTG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-3

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGAT ACTGGGTTAG CGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATAAT GTGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTGGGGTA GTCCTACGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-4

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGAGATTTAT TCGTGGTTAG CGTGGTACCA GCAGAGACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCTTCCCATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTGATTGGTG ATCCTGTTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-6

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTACGCTCCT GATCTATCGG TTGTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATAATG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-7

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATCTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG AATTCCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTTTGCGG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGG

Fig.51b (Cont III).

>DOM7h-8

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCCCTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATAGGG TGCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont IV).

>DOM7h-9

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTGGG TTGTGGTTAC ATTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG TCTTCCTTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTATAATT TGCCTTATAC GTCCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-12

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTITT CGGCATTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCG GCATCCCCTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTGCGCTGT ATCCTAAGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-16

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTATT AAGCATTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGGT GCATCCCCTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GGGGCTCGGT GGCCTCAGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-26

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAT TATCATTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAG GCATCCACGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTCGGAAGG TGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-1

GACATCCAGA CGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATCGTA TGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAGGG TAGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont V).

>DOM7r-13

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTCAT AGGGAGTTAA GGTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG GCGTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTATCTGC CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont VI).

>DOM7r-14

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTCAT AGGGAGTTAA GGTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG GCGTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTAATA CTGTCAACAG CGTTATAGGG TGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-15

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGTATTGGG CGGAGGTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGGCAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATCGT ACGTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTAATA CTGTCAACAG ACGTCGCAGT GGCCTCATACT GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-16

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTTAT AAGAATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT TCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTAATA CTGTCAACAG AGGTATCTGT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-17

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTTAT AATAATTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT ACTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTAATA CTGTCAACAG CGATGGCGTG CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-18

GACATTCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTAT AAGTCGTTAG GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG TCTTCTTTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTAATA CTGTCAACAG TATCATCAGA TGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont VII).

>DOM7r-19

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTATCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTAT AGGCATTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GCGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCAACA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTCATAATC CTCCTAAGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont VIII).

>DOM7r-3

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATATGC AGCCTTTTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-4

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGT CGGTATTTAC GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GGGTCCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGGTATCTTC AGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-7

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATTCTT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA GCGG

>DOM7r-5

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTTTCG CGTCAGTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATGGG GCGTCCGTTT TGCAAAGCGG GATCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATATTA CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAAGTCAA ACGG

>DOM7r-8

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTCAT AGGCAGTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAT GCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTTTTCTA AGCCTTCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont IX).

>DOM7h-23

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTAT GATTATAATA TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACGCATA CGGGTGGGGT TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAT
CCTTCTTATC AGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

Fig.51b (Cont X).

>DOM7h-21

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT CTTTATGATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGTTAATT CGGGTGTAG GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACTTAAT
 CAGAGTTATC ATTGGGATTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC

>DOM7h-22

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG AAGTATTGGA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTGATTTTA TGGGTCCGCA TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGAGG
 ACGTCGATGT TGCCGATGAA GGGGAAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAAC CCTGGTCACC
 GTCTCGAGC

>DOM7h-24

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCAT CGTTATTCGA TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTTGCCTG GTGGTGATGT TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGACG
 CCTGATTATA TGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-25

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG AAGTATAATA TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCTTGGTG AGGGTAATAA TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACGATG
 GATTATAAGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C

>DOM7h-26

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTACAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT GAGTATAATA TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCTGCCGC ATGGTGATCG GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACAGGAT
 CCTTTGTATA GGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

Fig.51b (Cont XI).

>DOM7h-27

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG GATTATCGGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTATTTTGA ATGTAAGTT TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGGAT
 TGGATGTATA TGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-30

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG ACGTATACTA TGGCTTGGGT CCGCCAGGCC
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTACTAGTA GTGGTTCTTC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGAAT
 TCTTTGTATA AGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-31

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG CCGACTAATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACTGGTA CTGGTGCTGC GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAT
 TCTCGTTATA GGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-20

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGGGG
 AAGGATTTT ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGCG

>DOM7r-27

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGTGAT
 GTTCTTAAGA CGGGTCTGGA TGTTTGTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTACCGTC
 TCGAGCG

Fig.51b (Cont XII).

>DOM7r-28

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTATG GCGTATCAGA TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCATCAGA CGGGTTTTTC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGCGT
TCTATGCGTC CTTATAAGTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
G

>DOM7r-21

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTAAT
CTTGAGCCGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG CG

Fig.51b (Cont XIII).

>DOM7r-25

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACTTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGACG
 GGTCCGTCGT CGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-22

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGT TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACTTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGCTT
 AGTAATGGTT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG CG

>DOM7r-23

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACTTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGGTT
 AAGGATAATA CGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-24

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACTTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAATACT
 GGGGGTAAGC AGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-26

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACTTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGGACT
 GAGAATAGGG GGGTTTCTTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
 G

Fig.51b (Cont XIV).

>DOM7r-29

GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG GATTATGATA TGA CT TGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAATG ATTTCTTCGT CGGGTCTTTG GACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTTTT
AGGCTGTTTC CTCGGACTTT TGA CT ACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
G