

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2009.07.29	(73) Titular(es): ELI LILLY AND COMPANY
(30) Prioridade(s): 2008.08.06 US 86557 P	LILLY CORPORATE CENTER INDIANAPOLIS, IN
(43) Data de publicação do pedido: 2011.06.08	46285 US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.08.14 213/2013	(72) Inventor(es): PENG LUAN US YING TANG US DERRICK RYAN WITCHER US DONMIENNE DOEN MUN LEUNG US PIA PAULIINA YACHI US
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS SELECTIVOS ANTI-HEPCIDINA-25 E UTILIZAÇÕES DOS MESMOS**

(57) Resumo:

PROPORCIONAM-SE ANTICORPOS MONOCLONAIIS QUE SE LIGAM AO EXTREMO N DE HEPcidina-25 HUMANA E QUE SÃO CARACTERIZADOS POR POSSUÍREM ELEVADA AFINIDADE E SELECTIVIDADE PARA O POLIPÉPTIDO. OS ANTICORPOS DO INVENTO SÃO ÚTEIS PARA AUMENTAREM OS NÍVEIS DE FERRO SÉRICOS, A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS, A CONTAGEM DE ERITRÓCITOS, A HEMOGLOBINA E/OU O HEMATÓCRITO NUM SER HUMANO E PARA O TRATAMENTO DE VÁRIOS DISTÚRBIOS, TAIS COMO ANEMIA, NUM SER HUMANO. OS ANTICORPOS DO INVENTO SÃO IGUALMENTE ÚTEIS COMO FERRAMENTAS ANALÍTICAS, COMO SEJA NUM ELISA TIPO SANDUÍCHE.

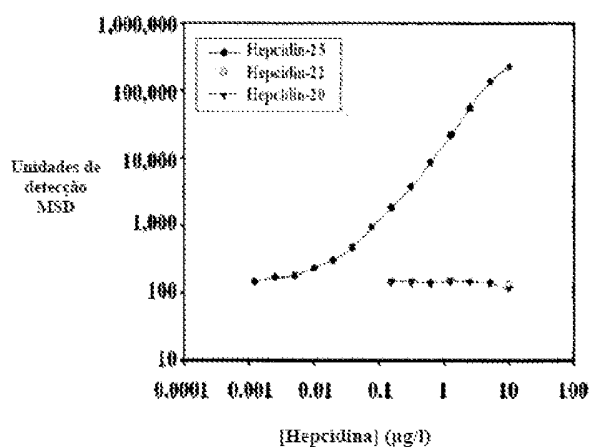
RESUMO**"ANTICORPOS SELECTIVOS ANTI-HEPCIDINA-25 E UTILIZAÇÕES DOS MESMOS"**

Figura 5

Proporcionam-se anticorpos monoclonais que se ligam ao extremo N de hepcidina-25 humana e que são caracterizados por possuírem elevada afinidade e selectividade para o polipéptido. Os anticorpos do invento são úteis para aumentarem os níveis de ferro séricos, a contagem de reticulócitos, a contagem de eritrócitos, a hemoglobina e/ou o hematócrito num ser humano e para o tratamento de vários distúrbios, tais como anemia, num ser humano. Os anticorpos do invento são igualmente úteis como ferramentas analíticas, como seja num ELISA tipo sanduíche.

DESCRIÇÃO**"ANTICORPOS SELECTIVOS ANTI-HEPCIDINA-25 E UTILIZAÇÕES DOS
MESMOS"**

O presente invento situa-se no campo da medicina, particularmente no campo dos anticorpos contra hepcidina-25 humana. Mais especificamente, o presente invento diz respeito ao tratamento de determinadas doenças, tais como anemia, através da administração de anticorpos selectivos anti-hepcidina-25 a doentes necessitados. A presente divulgação ainda diz respeito a métodos e estojos ("kits") para a detecção de hepcidina-25 e/ou diagnóstico de uma doença caracterizada por níveis elevados de hepcidina-25.

A hepcidina humana, um polipéptido expresso predominantemente pelos hepatócitos, crê-se que seja uma importante proteína reguladora do ferro que regula negativamente a absorção de ferro intestinal, a reciclagem do ferro pelos macrófagos e a mobilização do ferro a partir das reservas hepáticas de ferro. A produção excessiva de hepcidina parece desempenhar um papel importante na fisiopatologia da anemia e/ou na anemia de doença crónica.

Presentemente, são limitadas as terapias adequadas e eficazes para a anemia e/ou para a anemia de doença crónica. Especificamente, a administração de eritropoietina

é eficaz em apenas 50% de todos os doentes e está associada a efeitos secundários indesejáveis. Ainda, as transfusões são indesejáveis devido à contaminação, infecção e ferro em excesso.

A hepcidina humana é codificada por um prepro-peptido de 84 aminoácidos contendo uma sequência sinal típica de 24 aminoácidos, no extremo N, de transporte para o retículo endoplasmático e uma pro-região de 35 aminoácidos, com um local de clivagem pelo consenso da furina, imediatamente seguida dos 25 aminoácidos do extremo C de 25 aminoácidos da hormona reguladora do ferro (hepcidina-25, SEQ ID NO:1). Sabe-se que várias formas truncadas do extremo N de hepcidina, tais como hepcidina-20 (e.g., para seres humanos, aminoácidos 6-25 de SEQ ID NO:1) e hepcidina-22 (e.g., para seres humanos, aminoácidos 4-25 de SEQ ID NO:1) são formadas *in vivo*. No entanto, pensa-se que a hepcidina-25 seja a forma fisiologicamente mais relevante, senão a única da hepcidina nos seres humanos. As terapias que selectivamente regulam a concentração de hepcidina-25, em oposição ao precursor ou formas truncadas, são particularmente desejáveis. Em particular, os anticorpos que selectivamente se ligam a hepcidina-25 em oposição às formas de precursor e truncadas proporcionam numerosas vantagens no tratamento ou diagnóstico de distúrbios associados a níveis elevados de hepcidina-25. Por exemplo, comparativamente com anticorpos não selectivos para hepcidina, os anticorpos selectivos para hepcidina-25 de elevada afinidade reduzirão o risco de efeitos

secundários e a dose clínica necessária para o tratamento eficaz será inferior devido aos anticorpos terapêuticos não se ligarem a formas fisiologicamente irrelevantes de hepcidina. Se bem que tenham sido anteriormente descritos anticorpos policlonais e monoclonais não humanos contra hepcidina (ver e.g. Publicações de Pedido de Patente 2006/0019339, 2007/0224186, e 2008/0213277), existe ainda na área uma grande necessidade de anticorpos monoclonais que selectivamente se liguem a hepcidina-25. Assim, um aspecto do invento é a obtenção de anticorpos que selectivamente se ligam a hepcidina-25 humana dentro dos aminoácidos 1 a 7, inclusive, da hepcidina-25. Tais anticorpos são úteis para aumentar os níveis de ferro no soro, contagem de reticulócitos, contagem de eritrócitos, hemoglobina e/ou hematócrito num ser humano para o tratamento de uma doença, condição ou distúrbio como seja anemia.

Ainda, os imunoensaios existentes para hepcidina não diferenciam a hepcidina relevante, fisiologicamente activa, das espécies de hepcidina não relevantes, fisiologicamente inactivas (ver, por exemplo, Kemna E.H., *et al.*, *Haematologica* 93(1):90-7 (2008); Roe M.A., *et al.*, *Br J Nutr.*, 97:544-9 (2007); e Luuhhonen S. and Punnonen K., *Clin Chem Lab Med.*, 44:1361-2 (2006)). Presentemente, os únicos métodos disponíveis para testar selectivamente a hepcidina-25 envolvem LC/MS (cromatografia líquida/espectroscopia de massa) ou métodos similares trabalhosos que requerem a separação das várias formas de hepcidina (ver, por exemplo, Gutierrez, J.A., *et al.*, *BioTechniques*,

38:S13-S17 (2005), Murphy, *et al.*, Blood, 110:1048-54 (2007), and Kemna, E.H., *et al.*, Clin. Chem., 53:620-8 (2007)).). Ainda que estes ensaios possam ser precisos e exactos, a sua complexidade, custo, e o nível elevado de especialização do operador necessário, inibem a sua implementação de rotina. Assim, existe também a necessidade de anticorpos que selectivamente se ligam com elevada afinidade a hepcidina-25 humana para a sua aplicação em imuno-ensaios para a detecção ou medição de hepcidina-25. Assim, um outro aspecto do invento proporciona métodos de utilização de anticorpos selectivos para hepcidina-25 em imuno-ensaios relativamente simples mas altamente sensíveis, robustos e selectivos para a detecção e medição de hepcidina-25 em tecidos de mamífero e fluidos biológicos.

US 2006/0019339 pretende descrever anticorpos que se ligam a hepcidina e métodos de utilização daqueles anticorpos.

US 2007/0224186 pretende descrever anticorpos que se ligam ao extremo C de hepcidina humana e métodos de utilização daqueles anticorpos.

O presente invento proporciona anticorpos que selectivamente se ligam a hepcidina-25 humana dentro dos aminoácidos 1 a 7, inclusive, da hepacidina-25. Numa realização, um anticorpo do invento liga-se selectivamente a um polipéptido tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NO:1, em oposição aos precursores

relacionados e polipéptidos truncados e compreendem seis CDRs seleccionadas do grupo consistindo em: (i) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 32, 33 e 34, respectivamente; (ii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 12, 13, 14, 35, 36 e 37, respectivamente; (iii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 45, 13, 14, 35, 36 e 37, respectivamente; (iv) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 12, 13, 14, 38, 36 e 37, respectivamente; (v) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 15, 10, 16, 39, 40 e 41, respectivamente; (vi) LCDR 1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 42, 43 e 44, respectivamente; (vii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID Nos: 20, 21, 23, 42, 43 e 44, respectivamente; (viii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 24, 25, 23, 42, 43 e 44, respectivamente; (ix) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID Nos: 26, 25, 27, 42, 43 e 44, respectivamente; (x) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 26, 25, 28, 42, 43 e 44, respectivamente; (xi) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência

de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 6, 7, 8, 29, 30 e 31 respectivamente e (xii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 42, 43 e 44 respectivamente.

Numa outra realização, um anticorpo do invento liga-se a um epitopo contido nos aminoácidos 1 a 7, inclusive, da hepcidina-25 humana, *i.e.*, DTHFPIC de SEQ ID NO: 1 ou DTNFPIC da hepcidina-25 de roedor (SEQ ID NO: 2 ou 3). De preferência, o anticorpo do invento compreende um polipéptido da região variável da cadeia leve ("LCVR") e um polipéptido da região variável da cadeia pesada ("HCVR") em que (i) os polipéptidos de LCVR e de HCVR possuem as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 48 e 49, respectivamente; (ii) os polipéptidos LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra e SEQ ID NOs: 50 e 51, respectivamente; (iii) os polipéptidos LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 52 e 51, respectivamente; (iv) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOS: 53 e 54, respectivamente; (v) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 55 e 56, respectivamente; (vi) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 59 e 58, respectivamente; (vii) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 60 e 58, respectivamente; (viii) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 53 e 54, respectivamente; (ix) as LCVR e HCVR tendo as

sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 62 e 58, respectivamente; ou (x) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 63 e 58, respectivamente;

Numa outra realização, a divulgação proporciona moléculas de ácido nucleico isoladas codificadoras dos anticorpos do invento; vectores compreendendo moléculas de ácido nucleico codificadoras de anticorpos do invento, facultativamente, sequências de controlo operacionalmente ligadas reconhecidas por uma célula hospedeira transformada com o vector; células hospedeiras compreendendo vectores compreendendo moléculas de ácido nucleico codificadoras dos anticorpos do invento; um processo para a produção de um anticorpo do invento compreendendo a cultura de células hospedeiras compreendendo vectores compreendendo moléculas de ácido nucleico codificadoras dos anticorpos do invento de forma que o ácido nucleico seja expresso e, facultativamente, recuperação do anticorpo a partir do meio de cultura da célula hospedeira.

Numa outra realização, o invento proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo do invento e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável. De preferência, a composição farmacêutica compreende uma população homogénea ou substancialmente homogénea de um anticorpo monoclonal do invento e de um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Numa outra realização do invento, o invento proporciona um anticorpo do invento para usar em terapia.

Numa outra realização, o invento proporciona um anticorpo do invento para usar no tratamento ou prevenção de anemia.

O invento ainda proporciona um anticorpo do invento para usar no aumento dos níveis de ferro no soro, contagem de reticulócitos, contagem de eritrócitos, hemoglobina e/ou hematócrito num animal, de preferência uma espécie de mamífero, mais de preferência um ser humano

Uma outra realização da divulgação proporciona um método para o tratamento de uma doença, condição ou distúrbio, num ser humano, que beneficie de um aumento dos níveis séricos de ferro, contagem de reticulócitos, contagem de eritrócitos, hemoglobina e/ou hematócrito, incluindo mas não lhe estando limitado, anemia, e.g., anemia resultante da infecção, inflamação, doença crónica e/ou cancro.

A divulgação também proporciona um método para medição da quantidade de hepcidina-25 numa amostra de tecido ou fluido biológico obtida a partir de um mamífero, o referido método compreendendo os passos de: (i) obtenção de uma amostra ou tecido ou fluido biológico a partir do referido mamífero; (ii) colocação da referida amostra em contacto com um anticorpo selectivo anti-hepcidina-25 ou fragmento do mesmo; e (iii) detecção da quantidade de hepcidina-25 na referida amostra directa ou indirectamente

através de meios quantitativos, semi-quantitativos ou qualitativos.

Numa outra realização, o invento proporciona um método como reivindicado na Reivindicação 14.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 descreve um espectro de massa MALDI-TOF das formas de hepcidina humana imunoprecipitadas a partir de soros humanos com o Mab selectivo 3.23 anti-hepcidina-25.

O sinal 1 tem uma massa que é consistente com a massa esperada da hepcidina-25 humana intacta (massa molecular (MW) aproximada de 2790 Daltons (Da)). O sinal 2 tem uma massa consistente com a massa esperada para a hepcidina-20 humana intacta (MW de 2192 Da). Como o cromatograma demonstra, o Mab 3.23 anti-hepcidina-25 liga-se a quantidades detectáveis de hepcidina-25 e a quantidades muito inferiores de hepcidina-20. O Mab 3.23 não pareceu ligar-se a níveis detectáveis de hepcidina-22 (MW 2436 Da), hepcidina-24 (MW 2674 Da) ou pro-hepcidina (MW 6929 Da). O espectro de massa foi gerado num espectrómetro de massa MALDI-TOF utilizando um ião positivo, método modo linear com ácido ciano-4-hidroxicinâmico (matriz peptídica) como matriz da amostra essencialmente como descrito no Exemplo 6 abaixo.

A Figura 2 descreve uma vista amplificada do espectro de massa mostrado na Figura 1 numa região relevante (MW 2000-3000 Da). Como o cromatograma demonstra, o Mab 3.23 ligou-se a hepcidina-25 (Sinal 1) e, em menor grau, a hepcidina-20 (Sinal 2). O Mab 3.23 selectivo anti-hepcidina não pareceu ligar-se em níveis detectáveis a hepcidina-22 (MW 2436 Da) ou hepcidina-24 (MW 2674 Da).

A Figura 3 descreve um espectro de massa MALDI-TOF das formas de hepcidina imunoprecipitadas a partir de soros humanos com o Mab 5E8 anti-hepcidina-25. O sinal 1 tem uma massa que é consistente com a massa esperada de hepcidina-25 humana intacta (2790). Como o cromatograma demonstra, o Mab anti-hepcidina-25 liga-se apenas a quantidades detectáveis de hepcidina-25. O espectro de massa foi gerado num espectómetro de massa MALDI-TOF usando um ião positivo, método modo linear com um ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (matriz peptídica) como uma amostra matriz essencialmente como descrito na Exemplo 6 abaixo.

A Figura 4 descreve uma imagem amplificada do espectro de massa mostrado na Figura 1 numa região relevante (MW 2000-3000 Da). Como o cromatograma demonstra, o Mab 5E8 ligou-se a quantidades detectáveis de hepcidina-25 (Sinal 1). O Mab 5E8 não se ligou a níveis detectáveis de hepcidina-20 (MW de 2192 Da), hepcidina-22 (MW 2436 Da), hepcidina-24 (MW 2674 Da), ou pro-hepcidina (MW 6929 Da).

A Figura 5 mostra um gráfico de uma curva de calibração para hepcidina-25 gerada através da diluição

seriada de hepcidina-25 (círculos sólidos) começando numa concentração de 10 µg/l (10 ng/ml) e realizando o imunoensaio MSD descrito no Exemplo 8. O imunoensaio MSD foi específico de hepcidina-25 e não reconhece hepcidina-20 (triângulos a cheio) ou hepcidina-22 (círculos a cheio).

As abreviaturas que se seguem foram aqui usadas: ACN: acetonitrilo, BSA: albumina sérica bovina, DTT: diotritol, EDTA: ácido etilenodiaminatetracético, ELISA: ensaio imunossorvente ligado a enzimas, IMAC: cromatografia por afinidade de metal imobilizado, IPTG: isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo, Mab: anticorpo monoclonal, Mabs: anticorpos monoclonais, MALDI-TOF: espectrometria de massa com analisador de tempo voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz, PBS: soro fisiológico tamponado com fosfatos, SPR: ressonância de plasmões de superfície, TFA: ácido trifluoroacético. Todas as abreviaturas de aminoácidos usadas nesta divulgação são as aceites pelo United States Patent and Trademark Office como estabelecido em 37 C.F.R. § 1.822 (B) (2).

O presente invento proporciona anticorpos que selectivamente se ligam a hepcidina-25 dirigidos contra um epitopo contido dentro dos aminoácidos 1 a 7, inclusive, de hepcidina-25. Tais anticorpos são úteis para aumentaram os níveis de ferro sérico, contagem de reticulócitos, contagem de eritrócitos, hemoglobina e/ou hematócrito numa ser humano para o tratamento de uma doença, condição ou distúrbio, como seja anemia. Ainda, o presente invento proporciona métodos de utilização de tais anticorpos em imuno-

ensaios relativamente simples mas altamente sensíveis e selectivos para a detecção e/ou medição de hepcidina-25 em tecidos de mamífero e fluidos biológicos.

Quando aqui usado, o termo "hepcidina" refere-se a qualquer forma de proteína hepcidina conhecida por estar presente em mamíferos. Quando aqui usado, o termo "hepcidina madura" refere-se a qualquer forma bioactiva madura da proteína hepcidina expressa em mamíferos. Quando aqui usada, a frase "hepcidina humana" refere-se a qualquer forma da proteína hepcidina presente em humanos. Quando aqui usada, a frase "hepcidina-25 humana" refere-se à forma madura de hepcidina humana tendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1.

A estrutura geral de um anticorpo é muito bem conhecida na área. Para um anticorpo do tipo IgG, existem quatro cadeias de aminoácidos (duas cadeias "pesadas" e duas cadeias "leves") que estão associadas através de ligações dissulfureto intracadeias e intercadeias. Quando expressos em determinados sistemas biológicos, os anticorpos possuindo sequências Fc humanas não modificadas são glicosilados na região Fc. Os anticorpos podem ser igualmente glicosilados noutras posições. As estruturas de subunidades e as configurações tridimensionais de anticorpos são conhecidas na área. Cada cadeia pesada é constituída por uma região variável N-terminal da cadeia pesada ("HCVR") e uma região constante da cadeia pesada ("HCCR"). A região constante da cadeia pesada é constituída por três domínios (CH1, CH2 e CH3) para IgG, IgD e IgA; e 4 domínios

(CH1, CH2, CH3 e CH4) para IgM e IgE. Cada cadeia leve e constituída por uma região variável da cadeia leve (aqui "LCVR") e uma região constante da cadeia leve ("LCCR").

As regiões variáveis de cada par de cadeias leve/pesada formam o local de ligação ao anticorpo. As regiões HCVR e LCVR podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, designadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), entremeadas com regiões que são mais conservadas, designadas regiões estruturais (FR). Cada HCVR e LCVR é composta por três CDRs e quatro FRs, arranjadas do extremo amina para o extremo carboxilo na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Aqui, as três CDRs da cadeia pesada são referidas como "CDRH 1, CDRH2 e CDRH3" e as três CDRs da cadeia leve são referidas como "CDRL1, CDRL2 e CDRL3." As CDRs possuem a maioria destes resíduos que formam interacções específicas com o antigénio. A correspondência de cada aminoácido a cada um dos domínios é de acordo com convenções bem conhecidas (e.g., Kabat, "Sequences of Proteins of immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Os anticorpos do presente invento podem ter uma região constante da cadeia pesada seleccionada de qualquer uma das classes de imunoglobulina (IgA, IgD, IgG, IgM e IgE). De preferência, os anticorpos do presente invento possuem uma região constante que deriva da região Fc de IgG humana ou de murganho.

O termo "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo que deriva de uma única cópia ou clone, incluindo e.g., qualquer clone eucariótico, procariótico ou de fago e não o método pelo qual é produzido. De preferência, um anticorpo monoclonal do invento existe numa população homogênea ou substancialmente homogênea.

Um anticorpo do presente invento pode ser intacto, i.e., constituído por regiões constantes de tamanho completo ou total, incluindo a região Fc, ou ser uma porção ou fragmento de tal anticorpo desde que qualquer forma encurtada compreenda a porção de ligação ao antigénio e mantenha a capacidade de ligação ao antigénio. Tais formas encurtadas incluem, e.g., um fragmento Fab, fragmento Fab' ou F(ab')₂ que inclui as CDRs ou regiões variáveis dos anticorpos anti-hepcidina-25 descritos. Ainda, tais formas encurtadas do anticorpo podem ser um fragmento Fv de cadeia simples que pode ser produzido através da ligação do DNA codificador de LCVR e HCVR com uma sequência de ligação. (Ver, Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer" Verlag, New York, pp 269-315, 1994). Independentemente dos fragmentos ou porções serem especificados, o termo "anticorpo" como aqui usado inclui fragmentos ou porções assim como formas de cadeia simples a menos que de outra forma seja indicado. Desde que a porção proteica ou fragmento proteico mantenha a capacidade de selectivamente ligar hepcidina-25 e neutralize uma ou mais bioactividades características da

hepecidina-25 de mamífero, *in vivo* ou *in vitro*, está incluído no termo "anticorpo".

Os anticorpos do invento podem ser produzidos usando técnicas conhecidas na área, e.g., tecnologias re-combinantes, tecnologias de apresentação fágica, tecnologias de síntese química ou combinações de tais tecnologias facilmente conhecidas na área (ver, por exemplo, Jayasena S.D., Clin. Chem., 45:1628-50 (1999) and Fellouse, F.A., et al., J. Mol. Biol., 373(4):92440 (2007)).

As tabelas 1 e 2 abaixo descrevem CDRs para os anticorpos do presente invento.

Tabela 1

Fab	LCDRI	LCDR2	LCDR3
Consensus 1	SASSSX ₁ SX ₂ MY (SEQ ID NO: 6)	LTSX ₃ LAS (SEQ ID NO: 7)	QQWSSX ₄ PPT (SEQ ID NO: 8)
4C11	SASSSVSYMY (SEQ ID NO: 9)	LTSNLAS (SEQ ID NO: 10)	QQWSSNPPT (SEQ ID NO: 11)
1G8	SASSSASYMY (SEQ ID NO: 12)	LTSHLAS (SEQ ID NO: 13)	QQWSSGPPT (SEQ ID NO: 14)
1B4	SASPSVSYMY (SEQ ID NO: 45)	LTSHLAS (SEQ ID NO: 13)	QQWSSGPPT (SEQ ID NO: 14)
1E3	SASSSASYMY (SEQ ID NO: 12)	LTSHLAS (SEQ ID NO: 13)	QQWSSGPPT (SEQ ID NO: 14)
3A9	SASSSVSSMY (SEQ ID NO: 15)	LTSNLAS (SEQ ID NO: 10)	QQWSSYPPT (SEQ ID NO: 16)
Consensus 2	KSSQSLLYX ₅ NGKTYLT (SEQ ID NO: 17)	LVSKLDX ₆ (SEQ ID NO: 18)	X ₇ QGSHPWX ₈ (SEQ ID NO: 19)
5E8	KSSQSLLYSNGKTYLT (SEQ ID NO: 20)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 21)	VQGSHPWT (SEQ ID NO: 22)
OB3	KSSQSLLYSNGKTYLT (SEQ ID NO: 20)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 21)	HQGSHPWT (SEQ ID NO: 23)
OB1	KSSQSLLYRNGKTYLT (SEQ ID NO: 24)	LVSKLDP (SEQ ID NO: 25)	HQGSHPWT (SEQ ID NO: 23)
OH4	KSSQSLLYPNGKTYLT	LVSKLDP	IQGSHPWT

(continuação)

	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 27)
OE1	KSSQSLLYPNGKTYLT (SEQ ID NO: 26)	LVSKLDP (SEQ ID NO: 25)	FQGSHPFWV (SEQ ID NO: 28)

*X₁ é V ou A X₂ is Y ou S; X₃ é N ou H, X₄ é N, G ou Y; X₅ é S, R ou P; X₆ é S ou P; X₇ é V,H,I ou F; X₈ é T ou V

Tabela 2

Fab	HCDR1	HCDR2	HCDR3
Consen sus	GX ₉ SLX ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ G X ₁₃ GX ₁₄ G (SEQ ID NO: 29)	HIWWN X ₁₅ X ₁₆ K X ₁₇ YNT X ₁₈ LKS (SEQ ID NO: 30)	I X ₁₉ YYG X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ GFAY (SEQ ID NO: 31)
4C11	GFSLSYTGIGVG (SEQ ID NO: 32)	HIWWNDNKSNTALKS (SEQ ID NO: 33)	IGYYGSTSGFAY (SEQ ID NO: 34)
1G8	GYSLSYTGIGVG (SEQ ID NO: 35)	HIWWNDAKSNTALKS (SEQ ID NO: 36)	IGYYGSTAGFAY (SEQ ID NO: 37)
1B4	GYSLSYTGIGVG (SEQ ID NO: 35)	HIWWNDAKSNTALKS (SEQ ID NO: 36)	IGYYGSTAGFAY (SEQ ID NO: 37)
1E3	GLSLSTPGIGVG (SEQ ID NO: 38)	HIWWNDAKSNTALKS (SEQ ID NO: 36)	IGYYGSTAGFAY (SEQ ID NO: 37)
3A9	GFSLSYTGIGVG (SEQ ID NO: 39)	HIWWNGNKYYNTTLKS (SEQ ID NO: 40)	IHYGNSYGFAY (SEQ ID NO: 41)
Consen sus 2	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)
5E8	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)
OB3	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)
OB1	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)
OH4	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)
OE1	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)

* X₉ é F, Y ou L; X₁₀ é S ou N, X₁₁ é T ou S; X₁₂ é Y ou P, X₁₃ é I ou F; X₁₄ é V ou I; X₁₅ é D ou G; X₁₆ é A ou N; X₁₇ é S ou Y; X₁₈ é A ou T; X₁₉ é G ou H; X₂₀ é S ou N; X₂₁ é T ou S; X₂₂ é S, A ou Y.

A presente divulgação inclui, mas não lhes está limitada, um anticorpo que compreende:

a) uma região variável da cadeia leve compreendendo;

i) uma LCDR1 tendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 6, 9, 12, 45, 15, 17, 20, 24 e 26;

ii) uma LCDR2 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 7, 10, 13, 18, 21 e 25; e

iii) uma LCDR3 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 8, 11, 14, 16, 19, 22, 23, 17 e 28; e

b) uma região variável da cadeia pesada compreendendo:

i) uma HCDR1 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 29, 32, 35, 38, 39 e 42;

ii) uma HCDR2 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 30, 33, 36, 40 e 43; e

iii) uma HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 31, 24, 27, 41 e 44.

Como alternativa, um anticorpo preferido da divulgação compreende:

a) uma LCVR compreendendo:

i) a LCDR1 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 9, 12, 20 e 26;

ii) uma LCDR2 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 10, 13, 21 e 25; e

iii) uma LCDR3 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 11, 14, 23 e 27; e

b) uma HCVR compreendendo;

i) uma HCDR1 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 32, 35 e 42;

ii) uma HCDR2 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 33, 36 e 43; e

iii) uma HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 34, 37 e 44.

Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 42, 43 e 44, respectivamente.

Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 26, 25, 28, 42, 43 e 44, respectivamente.

Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 24, 25, 23, 42, 43 e 44, respectivamente.

Um anticorpo mais preferido do invento compreende uma LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 26, 25, 27, 42, 43 e 44, respectivamente.

Um anticorpo ainda mais preferido do invento compreende uma LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 32, 33 e 34, respectivamente.

Um anticorpo ainda mais preferido do invento compreende uma LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 12, 13, 14, 35, 36 e 37, respectivamente.

Um anticorpo ainda mais preferido do invento compreende uma LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 45, 13, 14, 35, 36 e 37, respectivamente.

Um anticorpo mais preferido do invento compreende uma LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a

sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 20, 21, 23, 42, 43 e 44, respectivamente.

Um anticorpo mais preferido do invento compreende uma LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 12, 13, 14, 38, 36 e 37, respectivamente.

Um anticorpo mais preferido do invento compreende uma LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 15, 10, 16, 39, 40 e 41, respectivamente.

Um anticorpo preferido do invento compreende uma LCVR tendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 46, 48, 50, 52, 53, 55, 57, 59, 60, 61, 62, e 63. Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma HCVR tendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID Nos: 47, 49, 51, 54, 56 e 58. Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma LCVR de SEQ ID NO:59 e uma HCVR de SEQ ID NO:58. Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma LCVR de SEQ ID NO:60 e uma HCVR de SEQ ID NO:58. Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma LCVR de SEQ ID NO:61 e uma HCVR de SEQ ID NO:58. Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma LCVR de SEQ ID NO:62 e uma HCVR de SEQ ID NO:58. Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma LCVR de SEQ ID NO:63 e uma HCVR de SEQ ID NO:58. Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma LCVR de SEQ ID NO:48 e uma HCVR de

SEQ ID NO:49. Um outro anticorpo preferido do invento compreende uma LCVR de SEQ ID NO:55 e uma HCVR de SEQ ID NO:56. Tais LCVRs estão de preferência ligadas à região constante de uma cadeia leve ou de uma cadeia pesada.

Anticorpos monoclonais preferidos do invento são referidos aqui como 4C11, 1G8, 1B4, 1E3, 3A9, 5E8, OB3, OB1, OH4 e OE1. As SEQ ID NOs das sequências de aminoácidos codificadoras dos Mabs 4C11, 1G8, 1B4, 1E3, 3A9, 5E8, OB3, OB1, OH4, OE1, 3.12, 3.23 e/ou vários fragmentos dos mesmos, são proporcionadas na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3

Mab	LC	HC	LC VR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HC VR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3
Conse nsus 1	64	65	46	6	7	8	47	29	30	31
4C11	66	67	48	9	10	11	49	32	33	34
1G8	68	69	50	12	13	14	51	35	36	37
1B4	70	69	52	45	13	14	51	35	36	37
1E3	71	72	53	12	13	14	54	38	36	37
3A9	73	74	55	15	10	16	56	39	40	41
Conse nsus 2	75	76	57	17	18	19	58	42	43	44
5E8	77	76	59	20	21	22	58	42	43	44
OB3	78	76	60	20	21	23	58	42	43	44
OB1	79	76	61	24	25	23	58	42	43	44
OH4	80	76	62	26	25	27	58	42	43	44
OE1	81	76	63	26	25	28	58	42	43	44
3.23	82	83								
3.12	84	85								

O termo "epitopo" refere-se à porção de uma molécula capaz de ser reconhecida e ligada por um anticorpo, numa ou mais regiões de ligação ao antigénio do anticorpo. Os determinantes epitópicos geralmente consistem em grupos quimicamente activos da superfície das moléculas, tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente possuem características tridimensionais específicas, assim como características de carga específicas. De preferência, os anticorpos do invento ligam-se a um epitopo no extremo N da hepcidina madura. Mais de preferência, os anticorpos do invento ligam-se a um epitopo contendo os aminoácidos 1 a 7, inclusive, de hepcidina-25. Mais de preferência, os anticorpos do invento ligam-se ao extremo N da hepcidina-25 humana. Mesmo mais de preferência, os anticorpos do invento ligam-se a um epitopo contido dentro dos aminoácidos 1 a 7, inclusive, de hepticina-25 humana. Mais de preferência, os anticorpos ligam-se a um epitopo contido nos aminoácidos DTHFPIC de SEQ ID NO: 1.

O termo "afinidade de ligação (K_D)" como aqui usado, destina-se a referir a velocidade de dissociação de uma interacção antigénio-anticorpo particular. O K_D é a razão entre a velocidade de dissociação, também designada "off-rate (K_{off})", e a velocidade de associação, ou "on-rate (K_{on})". Assim K_D é igual a K_{off}/K_{on} e é expresso como concentração molar (M). Consequentemente, quanto menor K_D , maior a afinidade de ligação. Assim, um K_D de 1 μ M indica afinidade de ligação fraca comparativamente com um K_D de 1

nM. Os valores de K_D podem ser obtidos pelos métodos conhecidos na área.

O termo "selectivo" aqui usado referindo-se a um anticorpo anti-heptacidina do invento refere-se a um anticorpo que se liga a hepcidina-25 com um K_D de aproximadamente 1000, 500, 200, 100, 50, 10 ou cerca de 5 vezes inferior àquele com que o anticorpo se liga a pelo menos uma forma de precursor da hepcidina-25 e/ou pelo menos uma forma truncada no extremo N de hepcidina-25 presente na mesma espécie de mamífero conforme medido por SPR a 25°C. Ainda, ou em alternativa, um anticorpo selectivo para hepcidina-25 do invento liga-se a hepcidina-25 mas não se liga ou liga-se apenas minimamente a pelo menos uma forma de precursor da hepcidina-25 e/ou a pelo menos uma forma truncada no extremo N da hepcidina-25 presente numa espécie de mamífero quando testado pelos métodos de imunoensaio e/ou espectrometria de massa MALDI-TOF descritos no Exemplo 4-8 abaixo. De preferência, a forma de precursor de hepcidina-25 é uma pro-hepcidina, mais de preferência, pro-hepcidina humana consistindo na sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:90. De preferência, a forma truncada no extremo N de hepcidina-25 é hepcidina-20 humana (*i.e.*, os aminoácidos 6-25 de SEQ ID NO:1) ou hepcidina-22 humana (aminoácidos 4-25 de SEQ ID NO:1).

O termo "detectar" ou "detecção" é usado no sentido mais lato para incluir medições quantitativas,

semi-quantitativas ou qualitativas de uma molécula alvo. Num aspecto, os métodos aqui descritos podem apenas determinar a presença ou ausência de um polipéptido hepcidina particular numa amostra biológica e, assim, que o polipéptido hepcidina é detectável ou, em alternativa, não detectável na amostra quando testada pelo método.

O termo "bioactivo", como referência a um anticorpo do invento, inclui, mas não está limitado a afinidade de ligação ao epitopo ou antígeno, a estabilidade *in vivo* e/ou *in vitro* do anticorpo, as propriedades imunogénicas do anticorpo, e.g., quando administrado a um ser humano, e/ou a capacidade para neutralizar ou antagonizar uma bioactividade de hepcidina-25, *in vivo* ou *in vitro*, incluindo mas não estando limitado a inibição da desregulação do nível de ferro no soro num modelo animal de inflamação, e.g., ensaio de inflamação experimental induzida por IL-6. As propriedades ou características atrás referidas podem ser observadas ou medidas usando técnicas reconhecidas na área incluindo, mas não estando limitado a ensaios de proximidade por cintilação, ELISA, imunoensaio ORIGIN (IGEN), extinção de fluorescência, ELISA por fluorescência, ELISA competitiva, análise SPR incluindo, mas não estando limitado a análise SPR usando um biossensor BIAcore, ensaios de neutralização *in vitro* e *in vivo* sem limite (ver, por exemplo, Publicação de pedido de Patente Internacional PCT N° WO 2006/02685).

O termo "bioactividade" referindo-se a hepcidina

inclui mas não está limitado a ligação específica de hepcidina a uma outra proteína incluindo, mas não lhes estando limitados, o seu receptor ferroportina, uma ou mais funções de hepcidina mediadas por ferroportina, tais como internalização induzida por hepcidina e/ou degradação de ferroportina (ver, e.g., Nemeth, E., et al., *Hepcidin Regulates Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization, Science 306, 2090-2093, (2004)*), regulação por hepcidina do efluxo de ferro mediado por ferroportina, decréscimo dos níveis de ferro no soro induzidos por hepcidina, contagem de reticulócitos, contagem de eritrócitos, hemoglobina e/ou hematócrito num ser humano, estabilidade da proteína, i.e., hepcidina que afecta os níveis ou actividade de uma outra proteína *in vivo* ou *in vitro*, e níveis de expressão de hepcidina e/ou distribuição nos tecidos.

O termo "inibir" ou "neutralizar" como aqui usado relativamente à bioactividade de um anticorpo do invento significa a capacidade do anticorpo para antagonizar substancialmente, proibir, evitar, restringir, retardar, destruir, eliminar, parar, reduzir ou reverter uma bioactividade de hepcidina, incluindo mas não estando limitado a uma bioactividade de hepcidina-25 humana, de rato ou de murganho.

Os termos "sujeito" e "indivíduo", usados indistintamente aqui, referem-se a um mamífero, de preferência um ser humano. Em determinadas realizações, o doente tem

uma doença, distúrbio ou condição que beneficiará de um decréscimo do nível de hepcidina, um decréscimo na bioactividade de hepcidina e/ou um aumento no nível de ferro no soro, contagem de reticulócitos, contagem de eritrócitos, hemoglobina e/ou hematócrito.

O termo "liga-se especificamente" como aqui usado na referência à ligação entre um anticorpo e um polipéptido hepcidina significa que o anticorpo se liga ao polipéptido hepcidina com um K_D inferior a cerca de 500 M conforme determinado por SPR a 25°C.

Numa realização, um anticorpo do invento possui um K_D para a hepcidina-25 humana (SEQ ID NO:1) inferior a cerca de 100 nM, inferior a cerca de 50 nM, inferior a cerca de 25 nM, inferior a cerca de 10 nM, inferior a cerca de 5 nM, cerca de 1 nM ou inferior a cerca de 800 pM, conforme determinado por SPR a 25°C. De preferência, um anticorpo do invento também se liga especificamente a pelo menos um polipéptido hepcidina maduro de uma espécie de mamífero não humano, conforme determinado por SPR a 25°C. Mais de preferência, o anticorpo também se liga especificamente a pelo menos um polipéptido hepcidina-25 seleccionado do grupo consistindo em hepcidina-25 de murganho, rato e macaco cinamólogo (SEQ ID Nos: 3, 2 e 4, respectivamente), conforme determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo também se liga especificamente a uma hepcidina-25 de macaco cinamólogo /SEQ ID NO:4), conforme determinado por SPR a 25°C. Mesmo

mais de preferência, o anticorpo também se liga especificamente a hepcidina-25 de murganho e/ou rato (SEQ ID NOS: 3 e 2, respectivamente), como determinado por SPR a 25°C.

Numa realização, um anticorpo do invento possui um K_D para hepcidina-25 humana (SEQ ID NO:1) inferior a cerca de 100 nM, inferior a cerca de 50 nM, inferior a cerca de 25 nM, inferior a cerca de 10 nM, inferior a cerca de 5 nM, cerca de 1 nM ou inferior a cerca de 800 pM, conforme determinado por SPR a 25°C e i) o anticorpo possui um K_D para pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEQ ID NO:88) ou hepcidina-22 humana (SEQ ID NO:89) que é pelo menos cerca de 200, cerca de 100, cerca de 50, cerca de 10 ou cerca de 5 vezes superior, conforme determinado por SPR a 25°C ou ii) a ligação do anticorpo a pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEQ ID NO:88) ou hepcidina-22 humana (SEQ ID NO:89) não é detectável ou minimamente detectável pelos métodos de imunoensaio e/ou espectrometria de massa MALDI-TOF descritos nos Exemplos 4-7. De preferência, o anticorpo também se liga especificamente a pelo menos um polipéptido hepcidina madura de uma espécie de mamífero não humano, como determinado por SPR a 25°C. Mais de preferência, o anticorpo também se liga especificamente a pelo menos um polipéptido hepcidina-25 selecionado do grupo consistindo em hepcidina-25 de murganho, rato e macaco cinamólogo (SEQ ID Nos: 3, 2 e 4, respectivamente), como determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo também se liga especificamente a

uma hepcidina-25 de macaco cinamólogo (SEQ ID NO:4), como determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo também se liga especificamente a hepcidna-25 de murganho e/ou rato (SEQ ID Nos: 3 e 2, respectivamente), como determinado por SPR a 25°C.

Numa outra realização, um anticorpo do invento possui um KD para hepcidina-25 (SEQ ID NO:1) entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM, como determinado por SPR a 25°C e i) o anticorpo possui um KD para pro-hepcidina-20 humana (SEQ ID NO:88) ou hepcidina-22 humana (SEQ ID NO:89) que é pelo menos cerca de 200, cerca de 100, cerca de 50, cerca de 10 ou cerca de 5 vezes superior, conforme determinado por SPR a 25°C ou ii) ligação do anticorpo a pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEQ ID NO:88) ou hepcidina-22 humana (SEQ ID NO:89) não é detectável ou minimamente detectável pelos métodos de imunoensaio e/ou espectrometria de massa MALDI-TOF descritos nos Exemplos 4-7. De preferência, o anticorpo também se liga especificamente a pelo menos um polipéptido hepcidina madura de uma espécie de mamífero não humano, como determinado por SPR a 25°C. Mais de preferência, o anticorpo também se liga especificamente a pelo menos um polipéptido hepcidina-25 seleccionado do grupo consistindo em hepcidina-25 de murganho, rato e macaco cinamólogo (SEQ ID Nos: 3, 2 e 4, respectivamente), como determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo também se liga especificamente a uma hepcidina-

25 de macaco cinamólogo (SEQ ID NO:4), como determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo também se liga especificamente a hepcidina-25 de murganho e/ou rato (SEQ ID Nos: 3 e 2, respectivamente), como determinado por SPR a 25°C.

Numa realização, um anticorpo do invento possui um K_D para hepcidina-25 (SEQ ID NO:1) inferior a cerca de 100 nM, inferior a cerca de 50 nM, inferior a cerca de 25 nM, inferior a cerca de 10 nM, inferior a cerca de 5 nM, cerca de 1 nM ou inferior a cerca de 800 pM, conforme determinado por SPR a 25°C. De preferência, um anticorpo do invento possui também um K_D entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para pelo menos um polipéptido de hepcidina madura de uma espécie de mamífero não humano, como determinado por SPR a 25°C. Mais de preferência, o anticorpo também possui um K_D entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para pelo menos um polipéptido hepcidina-25 selecionado do grupo consistindo em hepcidina-25 de murganho, rato e macaco cinamólogo (SEQ ID Nos: 3, 2 e 4, respectivamente), como determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo tem um K_D entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para uma hepcidina-25 de macaco cinamólogo (SEQ ID NO:4) como determinado por SPR a

25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo possui um K_D entre cerca de 100 e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para hepcidina-25 de murganho e/ou rato (SEQ ID Nos: 3 e 2, respectivamente) como determinado por SPR a 25°C.

Numa outra realização, um anticorpo do invento tem um K_D para hepcidina-25 humana (SEQ ID NO:1) entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM determinado por SPR a 25°C. De preferência, um anticorpo do invento também tem um K_D entre cerca de 100 e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para pelo menos um polipéptido hepcidina madura de uma espécie de mamífero não humano, determinado por SPR a 25°C. Mais de preferência, o anticorpo também tem um K_D entre cerca de 100 e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para pelo menos um polipéptido hepcidina-25 seleccionado do grupo consistindo em hepcidina-25 de murganho, rato e macaco cinamólogo (SEQ ID Nos: 3, 2 e 4, respectivamente), como determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo tem um K_D entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para uma hepcidina-25 de macaco cinamólogo (SEQ ID NO:4) como

determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo possui um K_D entre cerca de 100 e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para hepcidina-25 de murganho e/ou rato (SEQ ID Nos: 3 e 2, respectivamente) como determinado por SPR a 25°C.

Numa realização, um anticorpo do invento possui um K_D para hepcidina-25 (SEQ ID NO:1) inferior a cerca de 100 nM, inferior a cerca de 50 nM, inferior a cerca de 25 nM, inferior a cerca de 10 nM, inferior a cerca de 5 nM, cerca de 1 nM ou inferior a cerca de 800 pM, conforme determinado por SPR a 25°C e i) o anticorpo possui um K_D para pro-hepcidina humana, hepciina-20 humana (SEQ ID NO:88) ou hepcidina-22 humana (SEQ ID NO:89) que é pelo menos cerca de 200, cerca de 100, cerca de 50, cerca de 10 ou cerca de 5 vezes superior, conforme determinado por SPR a 25°C ou ii) a ligação do anticorpo a pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEQ ID NO:88) ou hepcidina-22 humana (SEQ ID NO:89) não é detectável ou minimamente detectável pelos métodos de imunoensaio e/ou espectrometria de massa MALDI-TOF descritos nos Exemplos 4-7. De preferência, o anticorpo tem um K_D entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para pelo menos um polipéptido hepcidina madura de uma espécie de mamífero não humano, como determinado por SPR a 25°C. Mais de preferência, o anticorpo também possui um K_D entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca

de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para pelo menos um polipéptido hepcidina-25 seleccionado do grupo consistindo em hepcidina-25 de murganho, rato e macaco cinamólogo (SEQ ID Nos: 3, 2 e 4, respectivamente), como determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo tem um K_D entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para uma hepcidina-25 de macaco cinamólogo (SEQ ID NO:4) como determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo possui um K_D entre cerca de 100 e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para hepcidina-25 de murganho e/ou rato (SEQ ID Nos: 3 e 2, respectivamente) como determinado por SPR a 25°C.

Numa outra realização, um anticorpo do invento tem um K_D para hepcidina-25 (SEQ ID NO:1) inferior a cerca de 100 nM, inferior a cerca de 50 nM, inferior a cerca de 25 nM, inferior a cerca de 10 nM, inferior a cerca de 5 nM, cerca de 1 nM ou inferior a cerca de 800 pM, conforme determinado por SPR a 25°C e i) o anticorpo possui um K_D para pro-hepcidina humana, hepciina-20 humana (SEQ ID NO:88) ou hepcidina-22 humana (SEQ ID NO:89) que é pelo menos cerca de 200, cerca de 100, cerca de 50, cerca de 10 ou cerca de 5 vezes superior, conforme determinado por SPR a 25°C ou ii) a ligação do anticorpo a pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEQ ID NO:88) ou hepcidina-22

humana (SEQ ID NO:89) não é detectável ou minimamente detectável pelos métodos de imunoensaio e/ou espectrometria de massa MALDI-TOF descritos nos Exemplos 4-7. De preferência, o anticorpo também se liga especificamente a pelo menos um polipéptido hepcidina madura de uma espécie de mamífero não humano, como determinado por SPR a 25°C. Mais de preferência, o anticorpo também possui um K_D entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para pelo menos um polipéptido hepcidina-25 selecionado do grupo consistindo em hepcidina-25 de murganho, rato e macaco cinamólogo (SEQ ID Nos: 3, 2 e 4, respectivamente), como determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo tem um K_D entre cerca de 100 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para uma hepcidina-25 de macaco cinamólogo (SEQ ID NO:4) como determinado por SPR a 25°C. Ainda mais de preferência, o anticorpo possui um K_D entre cerca de 100 e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM, entre cerca de 50 nM e cerca de 1 nM, ou entre cerca de 35 nM e 1 nM para hepcidina-25 de murganho e/ou rato (SEQ ID Nos: 3 e 2, respectivamente) como determinado por SPR a 25°C.

Expressão dos anticorpos

Usaram-se técnicas convencionais de biologia molecular para preparar o vector de expressão recombinante,

transfectar as células hospedeiras, seleccionar os transformantes, isolar linhas celulares de células hospedeiras produtoras de um anticorpo do invento, cultura destas células hospedeiras e recuperação do anticorpo a partir do meio de cultura.

A presente divulgação é também dirigida às células hospedeiras que expressam um anticorpo anti-hepcidina do invento. Pode ser usada uma larga variedade de sistemas hospedeiros de expressão para expressar um anticorpo do presente invento, incluindo sistemas de expressão procarióticos (bacterianos) e eucarióticos (tais como leveduras, baculovírus, plantas, células de mamíferos e de outros animais, animais transgénicos e células de hibridoma), assim como sistemas de apresentação fágica.

Um anticorpo do invento pode ser preparado através de expressão recombinante dos genes das cadeias leve e pesada de imunoglobulina numa célula hospedeira. para expressar um anticorpo por via recombinante, uma célula hospedeira é transformada, transduzida, infectada ou de outra forma recipiente de um ou mais vectores de expressão recombinantes portadores de fragmentos de DNA codificadores das cadeias leve e/ou pesada de imunoglobulina do anticorpo, de forma que as cadeias leve e/ou pesada sejam expressas na célula hospedeira. A cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas independentemente a partir de promotores diferentes a que estão operacionalmente ligadas num vector ou, em alternativa, a

cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas independentemente a partir de promotores diferentes a que estão operacionalmente ligadas em dois vectores - um expressando a cadeia pesada e um expressando a cadeia leve. Facultativamente, a cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas em diferentes células hospedeiras.

As células hospedeiras podem também ser usadas para produzir porções ou fragmentos de anticorpos intactos, e.g., fragmentos Fab ou moléculas de scFv, através de técnicas convencionais. Por exemplo pode ser desejável transfectar uma célula hospedeira com DNA codificador da cadeia leve ou da cadeia pesada de um anticorpo deste invento. A tecnologia de DNA recombinante pode também ser usada para remover algum ou a totalidade do DNA codificador das cadeias leve e pesada que não é necessário para a ligação a hepcidina-25 humana. As moléculas expressas a partir de tais moléculas de DNA truncadas estão também incluídas nos anticorpos do invento.

A divulgação proporciona uma célula hospedeira compreendendo uma molécula de ácido nucleico da presente divulgação. De preferência, uma célula hospedeira da divulgação compreende um ou mais vectores ou construções compreendendo uma molécula de ácido nucleico da presente divulgação. Por exemplo, uma célula hospedeira da divulgação é uma célula em que um vector da divulgação foi introduzido, o referido vector compreendendo um polinucleótido codificador de uma LCVR de um anticorpo do invento

e/ou um polinucleótido codificador de uma HCVR do invento. A divulgação também proporciona uma célula hospedeira em que os dois vectores da divulgação foram introduzidos; um compreendendo um polinucleótido codificador de uma LCVR de um anticorpo do invento e um compreendendo um polinucleótido codificador de uma HCVR presente num anticorpo do invento e cada um deles ligado operacionalmente a elementos reguladores estimulador/promotor (e.g., derivados de SV40, CMV, adenovírus e similares, tais como um estimulador de CMV/elemento regulador promotor AdMLP ou um estimulador de SV40/elemento regulador promotor AdMLP para dirigir níveis elevados de transcrição dos genes.

Uma vez expressos, os anticorpos intactos, cadeias leves e pesadas individuais ou outras formas de imunoglobulina do presente invento podem ser purificadas de acordo com procedimentos convencionais da área, incluindo precipitação com sulfato de amónio, cromatografia em coluna de permuta iónica, de afinidade (e.g., proteína A), de fase reversa, de interacção hidrofóbica, cromatografia em hidroxilapatite, electroforese em gel e similares. Imunoglobulinas substancialmente puras com pelo menos cerca de 90%, cerca de 92%, cerca de 94% ou cerca de 96% de homogeneidade são preferidas e cerca de 98 a cerca de 99% ou mais homogeneidade as mais preferidas, para usos farmacêuticos. Uma vez purificadas, parcialmente ou até à homogeneidade conforme pretendido, os anticorpos estéreis podem ser então usados terapeuticamente, como aqui indicado.

Anticorpo humano manipulado

De preferência, um anticorpo do invento a ser usado para fins terapêuticos, tem a sequência estrutural e a região constante (desde que exista no anticorpo) de origem humana, de forma a diminuir a possibilidade de o anticorpo induzir uma resposta imune. Os anticorpos humanos manipulados são de particular interesse uma vez que são importantes para aplicação terapêutica e para diminuir a probabilidade de uma resposta humana anti-murganho, frequentemente observada com anticorpos de origem murina ou anticorpos compreendendo porções que são de origem murina quando administrados a um ser humano. De preferência, os anticorpos humanos manipulados injectados podem ter uma semi-vida mais semelhante à dos anticorpos humanos naturais que e.g., anticorpos murinos, permitindo assim doses mais pequenas e menos frequentes a serem administradas a um indivíduo.

O termo "anticorpos humanos manipulados" como aqui usados refere-se a um anticorpo em que pelo menos uma porção é de origem humana. Por exemplo, o anticorpo humano manipulado pode compreender porções derivadas de um anticorpo de origem humana, como seja um murganho e porções derivadas de um anticorpo de origem humana, ligadas umas às outras, e.g., quimicamente por técnicas convencionais (e.g., de síntese) ou preparadas como um polipéptido contíguo usando técnicas de engenharia genética.

De preferência, um "anticorpo humano manipulado" possui CDRs que têm origem ou derivam de um anticorpo parental, *i.e.*, um anticorpo não humano, de preferência um Mab de murganho ou fragmento do mesmo, como seja Fab 4C11 de murganho, enquanto a região estrutural e a região constante, desde que presente, (ou uma parte significativa ou substancial do mesmo, *i.e.*, pelo menos cerca de 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) são codificadas por informação de sequência de ácidos nucleicos que ocorre na região da imunoglobulina germinal humana (ver, *e.g.*, a International ImMunoGeneTics Database) ou nas suas formas recombinadas ou mutadas quer os anticorpos sejam ou não produzidos numa célula humana. De preferência, pelo menos duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs de um anticorpo humano manipulado são optimizadas a partir das CDRs de um anticorpo parental não humano de onde o anticorpo humano manipulado deriva, para gerar uma propriedade pretendida, *e.g.*, especificidade, afinidade ou neutralização melhorada, que pode ser identificada através de um ensaio de rastreio, *e.g.*, um ensaio de ELISA. Uma CDR optimizada num anticorpo do invento compreende pelo menos uma substituição de aminoácido quando comparado com a presente no Fab parental 4C11, 3A9 ou 5E8. Determinadas substituições de aminoácidos nas CDRs de anticorpos humanos manipulados do invento comparativamente com as de Fab parental de murganho 4C11, 3A9 ou 5E8 diminuem a probabilidade de instabilidade do anticorpo (*e.g.*, remoção de um ou mais resíduos Asn da CDR) ou decréscimo da probabilidade de imunogenicidade do anticorpo quando administrado a um ser humano (*e.g.*, como

previsto por IMMUNOFILTER™ Technology (Xencor, Inc., Monrovia, CA).

Os anticorpos humanos manipulados, de preferência, possuem uma sequência mínima derivada de um anticorpo não humano. Os anticorpos humanos manipulados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente nem nas sequências CDR ou estruturais importadas do anticorpo parental. Os anticorpos humanos manipulados podem ser sujeitos a mutagénese *in vitro* usando métodos de rotina usados na área e, assim, as sequências de aminoácidos da região estrutural das regiões HCVR e LCVR dos anticorpos recombinantes humanos manipulados são sequências que, apesar de derivarem das relacionadas com sequências HCVR e LCVR germinais humanas, podem não existir naturalmente no repertório germinal de anticorpos humanos *in vivo*. Considera-se que tais sequências de aminoácidos das regiões estruturais de HCVR e de LCVR dos anticorpos recombinantes humanos manipulados são pelo menos cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 92%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 98% ou, mais de preferência, pelo menos cerca de 99% ou, mais de preferência, 100% idênticas à sequência germinal humana.

Em realizações preferidas, um anticorpo humano manipulado do presente invento compreende sequências estruturais da cadeia leve germinal humana e sequências estruturais da cadeia pesada germinal humana (ver, e.g., PCT WO 2005/005604).

Existem múltiplos métodos disponíveis na área para gerar anticorpos humanos manipulados (ver, e.g., Publicação de Pedido de Patente Internacional PCT WO 2006/06046935; Queen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869 (1991); Jones et al., *Nature*, 321:522 (1986); Riechmann, et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); e Verhoeyen, et al., *Science*, 239:1534 (1988)). Por exemplo, os anticorpos humanos manipulados podem ser produzidos através da obtenção de sequências de ácido nucleico codificadoras de HCVR e de LCVR de um anticorpo parental (e.g., um anticorpo murino ou um anticorpo preparado por um hibridoma) que selectivamente se liga a hepcidina-25, identificação das CDRs as referidas HCVR e LCVR (não humano) e enxerto de tais sequências de ácido nucleico codificadoras de CDR em sequências seleccionadas de ácido nucleico codificadoras de regiões estruturais humanas. Facultativamente, uma região CDR pode ser otimizada através de mutagénese aleatória ou em locais particulares de forma a substituir um ou mais aminoácidos na CDR com um aminoácido diferente antes do enxerto da região CDR na região estrutural. Como alternativa, uma região CDR pode ser otimizada após inserção na região estrutural humana usando métodos disponíveis para os familiarizados com a área.

Após as sequências codificadoras de CDR serem enxertadas nas sequências codificadoras estruturais humanas seleccionadas, as sequências de DNA resultantes codificadoras das sequências variáveis pesada e leve humanas

manipuladas são então expressas para produzir um anticorpo humano manipulado que se liga a hepcidina-25. HCVR e LCVR humanas manipuladas podem ser expressas como parte de uma molécula de anticorpo completa anti-hepcidina-25, *i.e.*, como uma proteína de fusão com sequências do domínio constante humano. No entanto, as sequências de HCVR e LCVR podem ser igualmente expressas na ausência de sequências constantes para produzir um Fv ou Fab humano manipulado anti-hepcidina-25, por exemplo (ver, *e.g.*, Watkins, J., *et al.*, Anal. Biochem. 253:37-45 (1997) e Watkins, J., *et al.*, Anal. Biochem. 256:169-177, (1998)).

Utilizações em diagnóstico

Os anticorpos do presente invento proporcionam os meios para detectar ou determinar com precisão as quantidades de hepcidina-25 num tecido ou fluido biológico para avaliação de predisposições a doenças e condições promovidas por hepcidina-25 e para detecção e diagnóstico de tais doenças e condições em doentes que sofram das mesmas. Por exemplo, os anticorpos selectivos para hepcidina-25 do invento podem ser incorporados em imunoensaios sensíveis e reprodutíveis, tais como ELISA, RIA e ensaios de imunodifusão ou ensaios de imunodetecção, tais como ensaios SPR. De forma semelhante, os anticorpos selectivos para hepcidina-25 do presente invento são igualmente úteis para ensaios de imuno-histoquímica (IHC) e imunofluorescência (IF) de amostras de tecido ou de fluidos biológicos. Tais análises podem ser usadas para detectar níveis

aberrantes de hepcidina-25 e portanto para diagnosticar doenças e condições promovidas por hepcidina-25. Mais especificamente, a presente divulgação proporciona métodos de diagnóstico de uma doença ou condição associada a hepcidina-25 num doente através da determinação do nível de hepcidina-25 numa amostra de tecido ou fluido biológico de um doente e comparação com o nível de hepcidina-25 na amostra com o nível de hepcidina-25 numa amostra correspondente de um ou mais indivíduos controlo ou com um padrão de referência, detectando assim um estado de doença associado com o nível anómalo de hepcidina-25. O estado de doença pode compreender uma ou mais doenças, genéticas ou não genéticas, associadas com níveis baixos de ferro no soro, contagem de reticulócitos, contagem de eritrócitos, hemoglobina e/ou hematócrito. De preferência, o estado de doença pode compreender uma ou mais doenças genéticas ou não genéticas associadas com anemia.

É também proporcionado um método de monitorização de uma doença ou condição associada a hepcidina-25. O método inclui determinação do nível de hepcidina-25 numa amostra de tecido ou fluido biológico de um doente que sofra ou esteja em risco de uma doença ou condição associada a hepcidina-25 numa primeira instância; determinação do nível de hepcidina-25 numa ou mais amostras de tecido ou fluido biológico do doente num ou mais pontos de tempo; comparação dos níveis de hepcidina-25 determinados em diferentes pontos de tempo e desta forma monitorização da doença ou condição promovida por hepcidina-25.

Os anticorpos selectivos para hepcidina-25 do presente invento são particularmente úteis quando aplicados a métodos de processamento de elevado número de amostras. Tais métodos incluem métodos de micro-chips e micro-arranjos, de forma que muitas amostras possam ser testadas numa microplaca ou lâmina, ou outro substrato de ensaio conhecido na área.

A presença de hepcidina-25 ou níveis da mesma numa amostra biológica pode ser estabelecida através da combinação da amostra biológica com, e.g., um anticorpo do invento em condições adequadas para formar um complexo antigénio-anticorpo. O anticorpo é marcado directamente ou, mais de preferência, indirectamente com um grupo detectável para facilitar a detecção do anticorpo ligado ou não ligado. Na área, é conhecida uma larga variedade de métodos de detecção da formação de imunocomplexos, por exemplo, ELISA, RIA, imunotransferência (e.g., transferência de pontos, transferência de traços, transferência Western, etc.), técnicas de imunofluorescência indirecta e métodos que se baseiam na detecção de alterações nos parâmetros físicos, tais como por exemplo, SPR, e similares. Tais aplicações incluem métodos que utilizam um anticorpo selectivo anti-hepcidina-25 do invento conjugado com um grupo detectável para detectar hepcidina numa amostra biológica, e.g., num fluido biológico ou numa célula ou extracto de tecido. Os anticorpos do invento podem ser usados em tais ensaios com ou sem modificação com um grupo

detectável. Se modificados com um grupo detectável, os anticorpos do invento podem ser modificados por ligação, covalente ou não covalente, do grupo detectável. Como aqui usado, o termo "detectável" descreve uma característica de uma substância (um conjugado, composto ou grupo) que permite a identificação ou seguimento da substância através de um detector, usando técnicas analíticas conhecidas. Exemplos representativos de grupos detectáveis incluem, sem limites, cromóforos, grupos fluorescentes, grupos fosforescentes, grupos luminescentes, grupos radioactivos, várias enzimas (tais como fosfatase alcalina ou peroxidase de rábano silvestre), grupos magnéticos (e.g., materiais diamagnéticos, paramagnéticos e ferromagnéticos) e aglomerados de metais pesados, assim como quaisquer outros grupos detectáveis conhecidos. A quantidade de um complexo convencional anticorpo-antigénio formado pode ser quantificada por vários métodos conhecidos na área, tais como, e.g., meios fotométricos ou colorimétricos. De preferência, os anticorpos do invento são usados sem modificação, i.e., marcado indirectamente, de acordo com métodos bem conhecidos na área.

O invento realiza um método para detecção da proteína hepcidina-25 numa amostra biológica, compreendendo incubação de um anticorpo do invento com uma amostra biológica em condições e durante um tempo suficiente para permitir que o referido anticorpo se ligue à proteína hepcidina-25 e detecção da referida ligação. De preferência, o anticorpo é 5E8, OH4 e/ou OB3. Um método

preferido para a detecção da proteína hepcidina-25 numa amostra biológica é uma ELISA tipo sanduíche, compreendendo incubação de um primeiro anticorpo do invento com a amostra biológica em condições e durante um tempo suficiente para permitir que o referido anticorpo se ligue à proteína hepcidina-25, remoção da amostra não ligada, aplicação de um segundo anticorpo que selectivamente se liga a um epitopo contido nos aminoácidos 1 a 7 de SEQ ID NO:1, remoção do segundo anticorpo não ligado e detecção do referido segundo anticorpo. De preferência, o primeiro anticorpo é 3.23 ou 3.12 e o segundo anticorpo é OH4 ou OB3. O mab 3.23 anti-hepcidina compreende dois polipéptidos de cadeia leve e dois polipéptido de cadeia pesada em que cada uma das cadeias polipeptídicas leves possui a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NO:82 e cada um dos polipéptidos da cadeia pesada possui a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NO:83 e liga-se a um polipéptido tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NO:1. O Mab 3.12 anti-hepcidina-25 compreende dois polipeptídeos de cadeia leve e dois polipeptídeos de cadeia pesada em que cada um dos polipéptidos da cadeia leve tem a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NO:84 e cada um dos polipéptidos da cadeia pesada possui a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NO:85 e liga-se a um polipéptido tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NO:1. Um método mais preferido para detecção da proteína hepcidina-25 numa amostra biológica é uma ELISA tipo sanduíche, compreendendo incubação de um primeiro anticorpo que se liga especificamente a um epitopo contido dentro dos

aminoácidos 5-15 de hepcidina na amostra biológica em condições e durante um tempo suficiente para permitir que o referido anticorpo se ligue às proteínas hepcidina, remoção da amostra não ligada, aplicação de um segundo anticorpo que se liga a um epitopo contido dentro dos aminoácidos 1 a 7 de hepcidina-25, remoção do segundo anticorpo não ligado e detecção da presença ou ausência de ligação do referido segundo anticorpo. De preferência, o primeiro anticorpo é 3.23 ou 3.12 e o segundo anticorpo é OH4 ou OB3. Mais de preferência, o segundo anticorpo não é marcado e a ligação é detectada indirectamente de acordo com métodos conhecidos na área.

O presente invento também proporciona composições, métodos e estojos ("kits") para rastreio de amostras suspeitas de conterem hepcidina-25. Tal rastreio pode ser realizado em amostras de doentes ou amostras de laboratório suspeitas de conterem ou produzirem tal polipéptido. Um estojo ("kit") pode conter um anticorpo selectivo anti-hepcidina do presente invento. O estojo ("kit") pode conter um tampão adequado e reagentes para detecção de uma interacção entre uma amostra e um anticorpo selectivo para hepcidina-25 do presente invento. O reagente proporcionado pode ser um agente marcado radioactivamente, marcado fluorescentemente ou marcado enzimaticamente capaz de se ligar ou interagir com um anticorpo do presente invento, como seja um anticorpo anti-IgG de murganho.

O reagente do estojo ("kit") pode ser proporcionado como uma solução líquida, ligado a um suporte

sólido ou como um pó seco. Quando o reagente é proporcionado numa solução líquida, de preferência, a solução líquida é uma solução aquosa. De preferência, quando o reagente é ligado a um suporte sólido, o suporte sólido pode ser meio cromatográfico, uma placa de teste tendo uma pluralidade de alvéolos ou uma lâmina de microscópio. Quando o reagente proporcionado é um pó seco, o pó pode ser reconstituído pela adição de um solvente adequado, o qual pode ser proporcionado igualmente no estojo ("kit").

O estojo ("kit") do invento é proporcionado num recipiente que, geralmente, inclui um contentor em que o anticorpo, antigénio ou reagente de detecção pode ser colocado e, de preferência, adequadamente distribuído. Os estojos ("kits") do presente invento tipicamente também incluirão um meio para conter o anticorpo, antigénio e contentores de reagentes para venda comercial. Tais contentores podem incluir recipientes de plástico nos quais os contentores pretendidos são acondicionados e um ou mais reagentes químicos necessários, como seja material de cromatografia, solventes e eluentes, tubos de teste, detergentes, anticorpos e químicos para a reacção de detecção.

Usos terapêuticos

As doenças ou condições promovidas pela hepcidina-25 podem ser prevenidas ou tratadas através da

administração, a um doente necessitado, de uma composição farmacêutica incluindo um anticorpo selectivo para hepcidina-25 um segundo anticorpo que se liga a um epitopo contido dentro dos aminoácidos 1 a 7, inclusive, de (1) hepcidina-25 humana, *i.e.*, DTHFPIC (SEQ ID NO: 5), e/ou (2) hepcidina-25 de murganho, *i.e.*, DTNFPIC (SEQ ID NO: 86).

Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo do invento pode ser usada para aumentar os níveis de ferro no soro, contagem de reticulócitos, contagem de eritrócitos, hemoglobina e/ou hematócrito num ser humano quando uma quantidade eficaz é administrada a um ser humano necessitado. Ainda, um anticorpo do invento pode ser útil para o tratamento de condições, doenças ou distúrbios em que a presença de hepcidina-25 causa ou contribui para efeitos patológicos indesejáveis ou um decréscimo dos níveis de hepcidina-25 ou da bioactividade de hepcidina tem benefício terapêutico em seres humanos. Tais condições, doenças ou distúrbios incluem anemia incluindo, mas não estando limitado a anemia resultante de infecção, inflamação, doença crónica e cancro. Os indivíduos podem ser do sexo masculino ou feminino. De preferência, um ser humano tem ou está em risco de ter nível sérico de ferro indesejavelmente baixo, baixa contagem de reticulócitos, de eritrócitos, hemoglobina e/ou hematócrito. Mais de preferência, um ser humano está em risco ou sofre de anemia incluindo, mas não estando limitado a anemia resultante de infecção, inflamação, doença crónica e/ou cancro.

Ainda, o invento proporciona o uso de um anticorpo do invento para a produção de um medicamento para o tratamento ou prevenção de anemia incluindo, mas não estando limitado a anemia resultante de infecção, inflamação, doença crónica e cancro.

Os anticorpos selectivos para hepcidina-24 do presente invento são também úteis para a prevenção e terapia de doenças e condições promovidas por hepcidina-25. Os Mabs selectivos anti-hepcidina do invento podem ser formulados em composições farmacêuticas para imunização passiva contra hepcidina-25. Os fragmentos funcionais dos MAbs do presente invento, tais como, por exemplo fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$ e quaisquer fragmentos que mantenham a capacidade para selectivamente se ligarem a hepcidina-25 podem também ser incorporados em composições farmacêuticas e aplicados em terapia.

Ainda, os Mabs selectivos para hepcidina-25 do presente invento podem ser aplicados em imunoensaios para monitorização da progressão de doenças ou condições promovidas por hepcidina-25, onde o nível ou quantidade de hepcidina-25 proporciona uma indicação do sucesso do tratamento ou terapia ou da progressão da doença ou condição.

Ainda, os Mabs do presente invento são úteis em métodos de avaliação de um tratamento de bloqueio da hepcidina-25 num doente que sofra de uma doença ou condição

promovida por hepcidina-25. Os métodos incluem os passos de:

a) obtenção de uma primeira amostra de fluido biológico do doente antes ou nas fases iniciais de um tratamento;

b) determinação do nível de hepcidina-25 na primeira amostra através de um método de imunoensaio;

c) obtenção de uma segunda amostra de fluido biológico do doente após um tempo adequado dentro do qual o tratamento terá um efeito;

d) determinação da quantidade de hepcidina-25 na segunda amostra através do método de imunoensaio,

e) comparação das quantidades determinadas de hepcidina-25 na primeira amostra com a quantidade de hepcidina-25 na segunda amostra de forma a determinar a eficácia do tratamento da ligação ou do bloqueio de hepcidina-25.

O método atrás descrito aplicado na avaliação de um tratamento de ligação a hepcidina-25 ou de um tratamento de bloqueio de hepcidina-25 num doente é particularmente importante na prática clínica, quando o tempo da decisão para prosseguir com um ou outro regime terapêutico pode ser crítico para o efeito final no doente. O método do presente invento proporciona informação sobre a base destas decisões críticas. O método proporciona uma medição da quantidade de hepcidina-25 antes do tratamento ou nas fases iniciais do tratamento e proporciona uma ou mais medições de hepcidina-

25 num ou mais períodos após início do tratamento, particularmente quando se espera que o tratamento comece a ser eficaz.

O tratamento de bloqueio da hepcidina-25 pode ser a administração passiva de anticorpo anti-hepcidina a um doente. O anticorpo selectivo anti-hepcidina-25 pode ser um anticorpo quimérico humano/não humano, um anticorpo monoclonal humanizado ou totalmente humano, selectivo, anti-hepcidina-25 ou qualquer fragmento de anticorpo selectivo para hepcidina-25 que seja funcional na ligação a hepcidina-25.

Na área, são conhecidos vários métodos de detecção da formação de imunocomplexos, por exemplo, ELISA, RIA, imunotransferência (e.g., transferência de pontos, transferência de traços, transferência Western, etc.), técnicas de imunofluorescência indirecta e métodos que se baseiam na detecção de alterações nos parâmetros físicos, tais como por exemplo, SPR. Num método largamente usado, a formação de imunocomplexos é detectada através do uso de uma marca, como seja uma marca radioactiva ou uma marca enzimática (como seja fosfatase alcalina ou peroxidase de rábano). Outras vantagens podem surgir através do uso de um ligando de ligação secundária como seja um anticorpo ou uma molécula acoplada a avidina para ligação a um ligando biotinilado, de acordo com métodos conhecidos na área.

Os termos "tratamento" e "tratar" como aqui

usados referem-se à administração de uma substância a um doente, o qual possui uma doença, condição ou distúrbio aqui descrito, um sintoma de tal doença, condição ou distúrbio ou uma predisposição para tal doença, condição ou distúrbio, com a finalidade de conferir um efeito terapêutico, e.g., para curar, aliviar, alterar, afectar, controlar, parar, melhorar ou prevenir a doença, condição ou distúrbio, um sintoma dele ou uma predisposição para ele. De preferência, o doente tratado é um mamífero e, mais de preferência, um ser humano. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para proporcionar a resposta óptima pretendida (e.g., uma resposta terapêutica). Por exemplo, pode ser administrado um único bolus, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada consoante indicado pelas exigências da situação terapêutica.

Composição farmacêutica

Um anticorpo do invento pode ser incorporado numa composição farmacêutica adequada para administração a um ser humano. Um anticorpo do invento pode ser administrado a um ser humano sozinho ou em combinação com um veículo e/ou diluente farmacêuticamente aceitável em doses simples ou múltiplas. Tais composições farmacêuticas são desenhadas para serem apropriadas ao modo de administração seleccionado e diluentes, veículos e/ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis, tais como agentes dispersores, tampões, tensioactivos, agentes de solubilização, agentes

de isotonicidade, estabilizadores e similares são usados conforme adequado. As referidas composições podem ser desenhadas de acordo com técnicas convencionais conhecidas na área.

Veículos adequados para composições farmacêuticas incluem qualquer material que, quando combinado com um Mab do invento, retenha a actividade da molécula e seja não reactivo com o sistema imune do indivíduo.

Uma composição farmacêutica compreendendo um Mab anti-hepcidina-25 do presente invento pode ser administrada a um indivíduo em risco de apresentar patologias como as aqui descritas, e.g., distúrbios de anemia, usando técnicas de administração convencionais.

A frase "quantidade eficaz" como aqui usada refere-se a uma quantidade necessária (em dosagens e durante períodos de tempo e para meios de administração) para se conseguir o resultado terapêutico pretendido. Uma quantidade eficaz do anticorpo pode variar de acordo com factores tais como estado de doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo para induzir uma resposta pretendida no indivíduo. Uma quantidade eficaz é também uma em que qualquer efeito tóxico ou prejudicial do anticorpo seja ultrapassado pelos efeitos benéficos em termos terapêuticos.

Uma quantidade eficaz é pelo menos a quantidade

mínima, mas menos que uma quantidade tóxica, de um agente activo que seja necessária para conferir benefício terapêutico a um indivíduo. Descrito de outra forma, uma quantidade eficaz ou quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo do invento é uma quantidade que em mamíferos, de preferência, humanos (i) aumenta os níveis séricos de ferro, a contagem de reticulócitos, a contagem de eritrócitos, a hemoglobina e/ou o hematócrito ou (ii) trata uma condição, distúrbio ou doença em que a presença de hepcidina-25 causa ou contribui para um efeito patológico indesejável ou (iii) um decréscimo dos níveis de hepcidina-25 ou da bioactividade de hepcidina-25 resulte num efeito terapêutico benéfico num mamífero, de preferência, um ser humano, incluindo mas não estando limitado a anemia, incluindo mas não estando limitado a anemia de doença crónica, incluindo mas não estando limitado a anemia resultante da infecção, inflamação, doença crónica e/ou cancro. Uma quantidade eficaz de um anticorpo do invento pode ser administrada numa dose única ou em múltiplas doses. Ainda, uma quantidade eficaz de um anticorpo do invento pode ser administrada em múltiplas doses de quantidades que seriam inferiores a uma quantidade eficaz se não administrada mais de uma vez.

Como é bem conhecido na área da medicina, as dosagens para qualquer indivíduo dependem de muitos factores, incluindo a frequência e via de administração, saúde geral e outros fármacos a serem administrados em simultâneo. A dose pode ainda variar dependendo do tipo e

gravidade da doença. Uma dose típica pode ser, por exemplo, na gama de cerca de 0,1 a cerca de 100 mg; de preferência, cerca de 1 a cerca de 100 mg; mais de preferência, cerca de 5 a cerca de 50 mg; no entanto, doses abaixo ou acima desta gama de exemplos são contempladas, especialmente considerando os factores atrás referidos. Um regime de dosagem parentérico diário pode ser 10 µg/kg a 10 mg/kg do peso total do corpo, de preferência entre cerca de 100 µg/kg e cerca de 10 mg/kg, mais de preferência entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. O progresso pode ser monitorizado através de avaliação periódica e a dose ajustada em concordância.

Estas quantidades de anticorpo sugeridas são sujeitas em grande parte a critérios terapêuticos. O factor chave na selecção da dose adequada e no regime é o resultado obtido. Os factores a ter em consideração neste contexto incluem o distúrbio particular a ser tratado, a condição clínica do doente individual, a causa do distúrbio, o local de entrega do anticorpo, o tipo particular de anticorpo, o método de administração, o regime e frequência de administração e outros factores conhecidos dos clínicos.

A via de administração de um anticorpo do presente invento pode ser oral, parentérica, por inalação ou tópica. De preferência, os anticorpos do invento podem ser incorporados numa composição farmacêutica adequada para administração parentérica. O termo parentérico como aqui é usado inclui administração intravenosa, intramuscular,

subcutânea, rectal, vaginal ou intraperitoneal. A entrega parentérica por injeção intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea é a preferida. A injeção subcutânea é a mais preferida. Os veículos adequados para tais injeções são conhecidos na área.

A composição farmacêutica tipicamente deve ser estéril e estável nas condições de produção e armazenamento ni contentor proporcionado, incluindo, e.g., uma ampola fechada, seringa ou outro sistema de entrega, e.g., uma caneta. Assim, as composições farmacêuticas podem ser esterilizadas por filtração após a sua formulação ou de outra forma tornadas microbiologicamente aceitáveis.

Os exemplos que se seguem são oferecidos apenas com fins ilustrativos e não pretendem limitar o âmbito do presente invento.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Produção de hepcidina-25 humana

A hepcidina-25 humana pode ser obtida a partir de fontes comerciais (e.g., (e.g., Peptide International (Louisville, KY)) ou produzida através de uma variedade de técnicas de síntese química ou recombinantes conhecidas na área. Por exemplo, uma proteína de fusão compreendendo os vinte e cinco aminoácidos de hepcidina-25 e tendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:95 é

expressa em *E. coli*. Os corpos de inclusão são isolados a partir de 3 litros de *E. coli* expressando a proteína de fusão de hepcidina-25 humana após indução de 3-6 horas com IPTG 1 mM, a 37°C. Os corpos de inclusão são solubilizados em tampão A (Tris 50 mM e ureia 8M (pH 8,0)). O sobrenadante é passado através de uma coluna de cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados ("Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography", IMAC) (20 ml de resina). A coluna é lavada com tampão A até a absorvância voltar à linha de base e os polipéptios ligados são eluídos em conjunto da coluna através de imidazole 0,5M no tampão A. A proteína de fusão hepcidina-25 humana é reunida e reduzida com DTT 50 mM. A proteína de fusão é então novamente enrolada através da diluição do material reunido em ureia 2M, cisteína 3 mM, Tris 50 mM (pH 8,0) para uma concentração proteica final inferior a 50 µg/ml. Este material foi agitado à temperatura ambiente e oxidado ao ar durante 48 horas. Os polipéptidos oxidados foram passados através de uma coluna IMAC (20 ml) a um fluxo de 5 ml/min e a proteína de fusão de hepcidina-25 humana foi eluída em bloco da coluna por imidazol 0,5M em tampão A. As fracções reunidas contendo a proteína de fusão hepcidina-25 humana foram concentradas e passadas através de uma coluna com restrição de tamanho (e.g., SUPERDEX® 75, GE Healthcare, XK26/60) equilibrada com Tris 50 mM, ureia 4M, pH 8,0, a um fluxo de 3 ml/min. A proteína de fusão monomérica eluída foi reunida e depois diluída para Tris 50 mM, ureia 2M, CaCl₂ 5 mM, pH 8,0 e depois clivada com enterocinase para produzir hepcidina-25 humana de SEQ ID

NO:1. A proteína de fusão de hepcidina-25 humana não clivada foi removida por cromatografia IMAC passiva (como descrito atrás). O material não retido na coluna IMAC foi então aplicado numa coluna de fase reversa C-18 a um fluxo de 4,0 ml/minuto. A coluna foi lavada com 0,1% TFA em água até a absorvância voltar à linha de base e os polipéptidos ligados serem eluídos da coluna com um gradiente linear de ACN entre 20% e 40% com 0,1% TFA a uma velocidade de 0,5%/min. As fracções que continham o polipéptido hepcidina-25 humana foram reunidas e analisadas por sequenciação dos aminoácidos N-terminais e espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS).

Os polipéptidos codificadores de hepcidina-25 de rato, murganho e macaco cinamólogo e várias formas truncadas no extremo N da hepcidina-25 humana, incluindo hepcidina-22 e hepcidina-20 foram produzidos essencialmente como descrito para a hepcidina-25 humana.

Exemplo 2: Produção de anticorpos anti-extremo N de hepcidina-25

Os murganhos foram imunizados com um péptido hepcidina N-terminal (aminoácidos 1-7 de SEQ ID NO:1) conjugado com um elemento de ligação de cinco aminoácidos (*i.e.*, GPGPG) a uma sequência de péptido OVA (aminoácidos 323-336), *i.e.*, o imunogénio completo é DTHFPICGPGPGISQAVH-AAHAEINE (SEQ ID NO:87), e os baços destes murganhos foram

colhidos no Dia 27. As células B foram distribuídas a 1 célula por alvéolo para células Ag⁺ e IgG⁺ de memória e dos centros germinais e foram co-cultivadas com células EL4B durante duas semanas. Os sobrenadantes contendo as IgG resultantes foram então diluídos 1,4 vezes e testados nos três formatos de ELISA seguintes: 1) placas de 96 alvéolos revestidas com proteína de ligação a NEUTRAVIDIN™, uma forma desglicosilada e isoelectricamente neutra de avidina (Pierce Biotechnology, Rockville, IL), a 2 µg/ml em tampão carbonato durante a noite. Os locais de ligação não específica foram bloqueados com caseína durante 1 hora. A placa foi então lavada 3 vezes com PBS com 0,05% de Tween-20 e hepcidina biotinilada 100 mM foi incubada na placa durante 1 hora. A placa foi novamente lavada como descrito. Os sobrenadantes de IgG da cultura foram então incubados durante 1 hora e a placa foi lavada. A ligação específica do anticorpo anti-hepcidina-25 foi detectada com 0,5 µg/ml de anticorpo de cabra anti-IgG Fcγ de murganho-fosfatase alcalina. A actividade de fosfatase alcalina foi medida pela adição de uma quantidade adequada de substrato PMP/AMP (6 mg/ml de monofosfato de fenolftaleína (PMP) em Tris 0,5M, pH 10,2, 2% de amino-2-metil-1-propanol (AMP), 0,1% NaN₃) e a quantidade de absorvância a 560 nm foi medida; 2) as placas de 96 alvéolos foram revestidas com anticorpo de cabra anti-IgG kapa de murganho a 2 µg/ml em tampão carbonato durante a noite. Os locais de ligação não específicos foram então bloqueados com caseína durante uma hora. A placa foi lavada 3 vezes com PBS com 0,05% Tween-20 e os sobrenadantes de IgG da cultura foram incubados durante 1

hora. Hepcidina-25 biotinilada (100 mM) foi então incubada na placa durante 1 hora e a placa foi lavada como anteriormente descrito. A ligação específica de hepcidina-25 ao anticorpo capturado foi então detectada pela adição de 1 µg/ml de NEUTRAVIDIN-AP™, um conjugado NEUTRAVIDIN™ - fosfatase alcalina (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) e detecção da actividade de fosfatase alcalina pela adição do substrato PMP/AMP e medição da absorvância a 560 nm; e 3) as placas de 96 alvéolos foram revestidas com hepcidina-25 100 mM em água durante a noite a 37°C. Os locais de ligação não específicos foram então bloqueados com caseína durante 1 hora e a placa foi lavada 3 vezes com PBS com 0,05% Tween-20. Os sobrenadantes com IgG da cultura foram então incubados durante 1 hora e a placa foi novamente lavada como descrito. A ligação específica do anticorpo contra o extremo N de hepcidina-25 foi detectada com anticorpo de cabra anti-IgG Fcy de murganho-fosfatase alcalina. A actividade de fosfatase alcalina foi medida com o substrato PMP/AMP e medida a quantidade de absorvância a 560 nm.

As células B que expressam anticorpos específicos do extremo N de hepcidina-25 tais como 3A9, 4C11 e 5E8 foram então usados para isolar RNA e as regiões variáveis foram amplificadas por RT-PCR e subsequentemente clonadas nos vectores comerciais de IgG1 de murganho ou respectivamente da cadeias pesada e leve. Os anticorpos de murganhos expressos transitoriamente foram confirmados como anticorpos específicos do extremo N de hepcidina-25 usando SPR.

Exemplo 3: Medições da ligação por afinidade de Fabs e Mabs anti-hepcidina usando SPR

Um biossensor SPR, como seja o BIAcore® T100, pode ser usado para medir a cinética de ligação e afinidade dos anticorpos tais como os anticorpos aqui descritos. O sistema BIAcore® utiliza as propriedades ópticas de SPR para detectar alteração na concentração de proteína das moléculas que interagem dentro da matriz do biossensor de dextrano. Excepto quando referido, todos os reagentes e materiais foram adquiridos à BIAcore® AB (Upsala, Suécia). Todas as medições foram realizadas a 25°C. As amostras foram dissolvidas em tampão HBS-EP (cloreto de sódio 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05% (p/v) do tensioactivo P-20 e HEPES 10 mM, pH 7,4). Para capturar os Fabs com cadeia capa humana, anticorpos de cabra anti-cadeia capa humana foram imobilizados em células de fluxo 1 a 4 de um chip sensor CM5 num nível de 5000-10000 unidades de resposta (Rus) usando um estojo ("kit") de acoplagem de amins. Para capturar Mabs com IgG1 de murganho, anticorpos de cabra anti-Fc gama de murganho foram imobilizados em células de fluxo 1 a 4 de um chip sensor CM5 num nível de 5000-1000 Rus usando um estojo ("kit") de acoplagem de amins. Para capturar anticorpos com IgG4 humana, a proteína A foi imobilizada nas células de fluxo 1 a 4 de um chip sensor CM4 num nível de 400-700 Rus usando um estojo ("kit") de acoplagem de amina. Fabs preparados a partir do periplasma de *E. coli* e os Mabs preparados a partir da cultura de células de mamífero foram avaliados usando múltiplos ciclos analíticos. Cada ciclo consiste nos seguintes passos: 0,3-2

minutos de injeção de um Fab ou de um Mab a ~10 µl/minuto numa captura de 200-1000 Rus, 2 minutos de injeção a 50 µl/minuto de várias concentrações de hepcidina-25 humana (desde 600 nM a 0,1 nM) obtido como descrito no Exemplo 1 atrás seguido de 2-10 minutos para dissociação e regeneração usando 30 µl de hidrocloreto de glicina 10 mM, pH 1,5. As medições foram obtidas a 25°C e as velocidades de associação e dissociação para cada ciclo foram avaliadas usando um modelo de ligação "1:1 com transferência de massa" no programa informático BIAevaluation.

Os anticorpos monoclonais de murganho 3A9, 4C11, 5E8, OB3, OH4, OB1 e OE 1 apresentam ligação a hepcidina-25 humana com uma afinidade (K_D) entre cerca de 36 nM e cerca de 1 nM. O anticorpo monoclonal de murganho OH4 liga-se a hepcidina-25 humana com um K_D de aproximadamente 1,2 nM mas não se liga de forma detectável a hepcidina-20 humana ou a hepcidina-22 humana. O anticorpo monoclonal de murganho 5E8 liga-se a hepcidina-25 humana mas não se liga de forma detectável a hepcidina-25 de murganho ou rato. O anticorpo monoclonal de murganho 4C11 liga-se a hepcidina-25 humana, de murganho e de rato e, em menor grau, a hepcidina-22 humana (cerca de 209 nM) mas não a hepcidina-20 humana.

Exemplo 4: Identificação de um par de Mabs que se ligam em simultâneo a hepcidina-25 humana

Os anticorpos monoclonais induzidos contra os aminoácidos 1-7, inclusive, de hepcidina-25 humana que

demonstraram elevada afinidade de ligação para hepcidina-25 humana por análise de SPR foram testados quanto à sua capacidade para se ligarem simultaneamente a hepcidina-25 humana com o Mab 3.23.

Resumidamente, num Biacore® T100, anticorpos policlonais de cabra anti-Fc de IgG1 de murganho foram imobilizados nas células de fluxo 1 a 4 do chip CM5 a 5000-15000 unidades de resposta (Ru). O Mab 5E8 foi capturado na célula de fluxo 2, o Mab 4C11 foi capturado na célula de fluxo 3 e o Mab 3A9 foi capturado na célula de fluxo 4. A célula de fluxo 1 foi usada como célula de fluxo de referência. Todas as células de fluxo foram então injectadas com hepcidina-25. As células de fluxo com os Mabs 5E8, 4C11 e 3A9 imobilizados apresentaram todas aumento de Rus, indicando a ligação dos Mabs a hepcidina-25 humana. Em seguida, todas as células de fluxo foram injectadas com Mab 3.23. Apenas a célula de fluxo 2, com o Mab 5E8 imobilizado, mostrou ligação simultânea de hepcidina-25 humana pelos Mabs 5E8 e 3.23.

Ainda, os Mabs Hu22, 3.23, 3.12 e um anticorpo IgG4 humano controlo negativo foram imobilizados em células de fluxo separadas de um chip Sensor Chip_CM4 (Biacore) a 1000-4000 Rus. As células de fluxo foram então injectadas com hepcidina-25 humana. Em seguida as células de fluxo foram injectadas com Mab 5E8. As células de fluxo com os Mabs H22, 3.23 e 3.12 imobilizados mostraram ligação de hepcidina-25 e depois ligação simultânea do Mab 5E8. A

célula de fluxo tendo o controlo negativo de IgG4 humana imobilizado não mostrou ligação a hepcidina-25 humana ou ao Mab 5E8. Ainda, o Mab 5E8 não se liga a hepcidina-25 em simultâneo com o anti-soro policlonal de coelho induzido contra os péptidos conjugados com KLH consistindo nos aminoácidos 1-7 de hepcidina-15 humana e de murganho (Alpha Diagnostic International, San Antonio TX; cat. # Hepcl3-S) ou com uma sua preparação de IgG purificada (Alpha Diagnostic International, San Antonio TX; cat. # Hepcl3-A)).

Exemplo 5: Ensaio de ELISA tipo sanduíche para medição de hepcidina-25 humana

Os alvéolos de uma placa de múltiplos alvéolos foram revestidos durante 1 hora à temperatura ambiente com o Mab 3.23 numa concentração de 2 mg/l em tampão de revestimento carbonato-bicarbonato, pH 9,40 (Pierce Biotechnology, Rockville, IL). Em seguida, os alvéolos foram aspirados e lavados 3 vezes com TBST (soro fisiológico tamponado com fosfatos 10 mmol/l Tris pH 7,4, NaCl 150 mmol/l com 1 ml de Tween-20/l). Os alvéolos foram então bloqueados durante 1 hora com tampão de bloqueio TBS-caseína (NaCl 150 mM, Tris 25 mM, 1% caseína, pH 7,4 com o antimicrobiano Kathon ((Pierce Biotechnology; cat. # 37532). Em seguida, 100 µl de um padrão de hepcidina-25 (variando as concentrações de hepcidina-25 humana sintetizada no tampão de ensaio consistindo em 50 mmol/l de HEPES, pH 7,4, 150 mmol/l NaCl, 10 ml/l do tensioactivo não

iónico Triton® X-100 (Union Carbide Corp., Danbury, CT), 5 mmol/l EDTA, e 5 mmol/l de ácido etilenodiaminatetracético (EGTA) foram adicionados a uma série de alvéolos para gerar uma curva de calibração. Em seguida, as amostras de soro foram diluídas a 1:20 em tampão de ensaio e adicionadas aos respectivos alvéolos e a placa de ELISA foi deixada a incubar durante 1 hora à temperatura ambiente. Após aspiração, os alvéolos foram lavados 3 vezes com TBST e 100 µl de uma diluição a 1:1000 do Mab 5E8 anti-hepcidina-25 biotinilado a 1 mg/ml foi adicionado aos alvéolos durante 1 hora de incubação à temperatura ambiente. Após aspiração, os alvéolos foram lavados 3 vezes com TBST e 100 µl de uma diluição a 1:1000 do Mab 5E8 anti-hepcidina-25 biotinilada a 1 mg/ml foi adicionado aos alvéolos durante 1 hora de incubação à temperatura ambiente. Após aspiração, os alvéolos foram lavados 3 vezes com TBST e 100 µl de uma solução de poli-estreptavidina-HRP (Pierce Biotechnology, Rockville, IL) foram adicionados aos alvéolos para uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Os alvéolos foram então lavados 3 vezes com TBST. Após a última aspiração de TBST, 100 µl do substrato de revelação 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Pierce Biotechnology, Rockville, IL) foram adicionados aos alvéolos e deixados a incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente. A reacção foi parada com um volume igual de ácido fosfórico 2N e as placas lidas a 450 nm.

Concentrações séricas de hepcidina-25 de 40 doentes normais e com cancro, medidas pelo ELISA tipo

sanduiche descrito atrás, variaram entre 5 e 656 µg/l e estavam directamente correlacionadas com as concentrações séricas de hepcidina-25 medidas usando um ensaio LC/MS padrão ($r=0,98$, $p<0,0001$) (ver Murphy, et al., (2007)). Igualmente, 100 amostras de soro humano de dadores saudáveis (50 indivíduos do sexo masculino e 50 do sexo feminino; gama de idades entre 18 e 66 anos, média 37 anos) obtidas da Bioreclamation, Inc. (East Meadow, NJ) foram determinadas como tendo concentrações de hepcidina-25 variando entre <1-79 µg/ml. Ainda, o ELISA tipo sanduiche detectou o péptido controlo hepcidina-25 humano numa forma dependente de dose até pelo menos 1 ng/ml. Por outro lado, nem o péptido controlo hepcidina-25 humana (até 2 ng/ml) nem a hepcidina-25 endógena numa amostra de soro humana controlo positivo, i.e., previamente determinado pelo ensaio LC/MS como contendo hepcidina-25, é detectável no mesmo ensaio quando o Mab 5E8 foi substituído com i) anti-soro policlonal de coelho induzido contra péptidos conjugados com KLH consistindo nos aminoácidos 1-7 de hepcidina-25 humana e de murganho (Alpha Diagnostic International, San Antonio TX; cat. # Hepcl3-S) ou ii) uma preparação de IgG purificada do mesmo (Alpha Diagnostic International; cat.# Hepcl3-A)). Ainda, nem o padrão de hepcidina-25 nem o controlo positivo de amostra de soro humano foram detectáveis quando o anti-soro HEPC13-S ou a sua preparação de IgG purificada i) revestiam alvéolos separados da placa de ensaio, i.e., como anticorpos de captura, ii) foram adicionados ao ensaio como anticorpos de detecção conjugados com biotina ou iii) foram adicionados

ao ensaio como anticorpos de detecção não conjugados, *i.e.*, com a sua ligação subsequentemente testada usando um anticorpo secundário anti-IgG de coelho.

O péptido controlo de hepcidina-25 humana e a hepcidina endógena na amostra controlo positivo de soro humano não foram detectados quando o ELISA tipo sanduíche foi realizado usando o Mab 5E8 como anticorpo de captura e em simultâneo com IgG policlonal de coelho comercial induzida contra um conjugado de KLH, o péptido de 13 amino-ácidos C-terminais da hepcidina humana madura (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX; cat. # HEPC12-A).

Exemplo 6: Determinação da selectividade dos anticorpos anti-hepcidina usando MALDI-TOF

O diagnóstico clínico de rotina de biomarcadores baseia-se essencialmente em técnicas imunológicas quantitativas, *e.g.* ELISA. Estes métodos são frequentemente não aplicáveis a pequenos antigénios ou a isoformas de antigénios (Sparbier, K., International Meeting of the Association of Biomolecular Resource Facilities, Salt Lake City, UT, Poster V28-S, (2008); e Gutierrez, J.A., *et al.*, (2005)). Os Mabs ou Fabs podem ser avaliados quanto à sua capacidade para imunoprecipitarem selectivamente hepcidina-25 endógena, em vez dos precursores ou formas truncadas dos mesmos, a partir de soro humano, via espectrometria de massa MALDI-TOF em polipéptidos de hepcidina ligados a anticorpos realizada após redução da amostra.

Os Mabs ou Fabs anti-hepcidina humana são usados para revestir alvéolos separados de uma placa de ELISA convencional de 96 alvéolos em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,4) durante 1 hora à temperatura ambiente numa concentração de 2 mg/l. Os alvéolos foram então aspirados e lavados 3 vezes com TBST. As amostras de soro humano contendo uma quantidade conhecida de hepcidina-25 (diluída em tampão de ensaio) foram adicionadas a 100 µl/alvéolo durante uma hora à temperatura ambiente. Os alvéolos foram aspirados e lavados 3 vezes com TBST. Os polipéptidos de hepcidina capturados foram eluídos através da adição de 40 µl/alvéolo de ácido fórmico a 0,1% durante 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras eluídas foram colhidas e concentradas com um C4 ZipTip™ (Millipore, Billerica, MA), uma ponta de pipeta de 10 µl com um leito de meio de cromatografia para purificação e concentração de fentomoles a picomoles de proteína ou péptidos, idealmente variando entre MW 25000 e MW 100000. Metade de um microlitro de amostra foi aplicado num alvo MALDI e um volume igual de solução de matriz (50% acetonitrilo, 0,1% TFA saturado com ácido alfa-cian-4-hidroxicinâmico) foi adicionado à amostra. A amostra foi seca e analisada com um espectrómetro de massa 4700 TOF-TOF (Applied Biosystems) operado no modo linear.

As experiências realizadas usando a espectrometria de massa MALDI-TOF, essencialmente como descrito imediatamente atrás, mostraram que o Mab 3.23 se ligou a

hepcidina-25 e, em menor grau, a hepcidina-20 (Figuras 1 e 2). O Mab 3.23 não pareceu ligar-se em níveis detectáveis a hepcidina-22 (MW 2436 Da), hepcidina-24 (MW 2674 Da) ou pro-hepcidina (MW 6929), assumindo, certamente, que as amostras de soro testadas também continham as quantidades esperadas destas formas de hepcidina humana.

Experiências semelhantes foram realizadas usando espectrometria MALDI-TOF para determinar qual a espécie de hepcidina em soro humano se liga ao Mab 5E8. Estas experiências determinaram que o Mab 5E8 se liga apenas a hepcidina-25 em soro humano (Figuras 3 e 4). É importante salientar que hepcidina-20, hepcidina-22, pro-hepcidina ou outra espécie de hepcidina não se ligaram ao Mab 5E8, novamente, assumindo que estas espécies de hepcidina humana estavam presentes nas amostras de soro como esperado.

Assim, os imunoensaios usando o Mab 5E8, ou anticorpos derivados do mesmo ou com ele relacionados, incluindo mas não estando limitado ao Mab OH4, são altamente específicos e selectivos para hepcidina-25 humana, a forma activa fisiologicamente relevante de hepcidina no soro humano. Espera-se que outras melhorias na especificidade e/ou selectividade nos imunoensaios para hepcidina-25 humana que combinem o uso do Mab 5E8 ou anticorpos derivados ou relacionados, incluindo mas não estando limitado a Mab OH4, Mab 3.23 e Mab 3.12 ou anticorpos derivados ou relacionados.

Exemplo 7: Ensaio de ELISA tipo sanduíche para medição de hepcidina-25 humana (sem a marcação directa de anticorpos)

Um ELISA tipo sanduíche foi realizado como no Exemplo 5, excepto i) o anticorpo conjugado marcado foi substituído com OH4 não marcado e ii) a ligação do OH4 foi detectada indirectamente através do uso de um anticorpo de cabra anti-murganho conjugado com peroxidase de rábano selvagem.

Usando o Mab 3.23 e o Mab OH4 num ELISA tipo sanduíche como descrito atrás, hepcidina-25 humana foi selectivamente detectada em soro humano com uma sensibilidade de aproximadamente 0,2 ng/ml.

Exemplo 8: Imunoensaio "Meso Scale Discovery" para medição de hepcidina-25

Um imunoensaio para hepcidina-25 humana "Meso Scale Discovery" (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) (MSD) foi construído usando os reagentes atrás descritos. Resumidamente, 1 mg do Mab OH4 foi biotinilado usando um estojo ("kit") comercial (Pierce Biotechnology, Rockville, IL) diluído em 50% de glicerol e guardado a -20°C até ser necessário. Os alvéolos revestidos com estreptavidina e bloqueados de uma placa de ELISA foram incubados durante 1 hora com Mab biotinilado numa concentração de 2 mg/l. Em seguida, os alvéolos foram aspirados e lavados três vezes

com TBST (soro fisiológico tamponado com Tris contendo 10 mmol/l de Tris pH 7,40, 150 mmol/l NaCl com 1 ml de Tween 20/l). Em seguida, foram adicionados 100 µl de padrões de hepcidina (várias concentrações de proteína hepcidina-25 sintetizada em tampão de ensaio consistindo em 50 mmol/l de HEPES, pH 7,40, 150 mmol/l NaCl, 10 mL/l Triton X-100, 5 mmol/l EDTA, e 5 mmol/L EGTA) aos alvéolos para gerar uma curva de calibração. Ao mesmo tempo, as amostras de soro foram diluídas a 1:20 em tampão de ensaio e adicionadas aos respectivos alvéolos e a placa de ELISA foi deixada a incubar durante 1 hora à temperatura ambiente. Após aspiração, os alvéolos foram lavados três vezes com TBST e 100 µl de uma diluição a 1:1000 de Mab 3.23 marcado com ruténio a 1 mg/ml foram adicionados aos alvéolos durante 1 hora de incubação à temperatura ambiente. Após aspiração, os alvéolos foram lavados três vezes com TBST e a placa de ELISA foi revelada usando um leitor MSD, o qual passou uma voltagem através dos alvéolos e registou a electroquimioluminescência de cada alvéolo. Para ajustar as curvas de calibração para a ELISA usou-se o programa MSD e SigmaPlot versão 8.0.

O par óptimo de anticorpos no imunoensaio tipo sanduíche MSD foi determinado como sendo o par Mab OH4 como anticorpo de captura e Mab 3.23 como anticorpo conjugado. A proteína hepcidina-25 sintetizada foi preparada numa concentração de 10 µg/l e diluída sucessivamente para criar uma curva padrão. Como a Figura 5 indica, encontrou-se que o ELISA tem uma gama dinâmica, fundo e sensibilidade

aceitáveis. Com base em três avaliações de desvio padrão relativamente ao calibrador zero, a sensibilidade do imunoensaio foi determinada como sendo melhor que 0,01 µg/l, indicando que o imunoensaio deverá ter sensibilidade mais do que adequada para medir os níveis de hepcidina-25 sérica humana, baseado nas estimativas prévias dos níveis de hepcidina-25 sérica humana conforme medido por ensaios tipo LC/MS (Murphy, *et al.*, (2007)). Os dados representados graficamente na Figura 2 também indicam que o imunoensaio tipo sanduíche MSD é selectivo para hepcidina-25 uma vez que não detecta hepcidina-20 ou hepcidina-22. Ainda, as curvas de diluição do imunoensaio para o padrão recombinante e as amostras de soro humano foram determinadas como sendo paralelas e o imunoensaio demonstrou excelente linearidade quando da diluição de amostras de soro humano (dados não apresentados).

A selectividade e sensibilidade do método de imunoensaio tipo sanduíche MSD foram comparadas com o ensaio padrão de excelência anteriormente descrito LC/MS (Murphy, *et al.*, (2007)). Mais especificamente, cinquenta e duas (52) amostras de soro humano de uma mistura de indivíduos normais e de doentes com cancro foram analisadas usando o imunoensaio tipo sanduíche MSD, assim como o ensaio LC/MS anteriormente descrito que se demonstrou ser específico para hepcidina-25 (Murphy, *et al.*, (2007)). Os resultados desta comparação mostraram que os valores de hepcidina-25 determinados usando o imunoensaio MSD estavam altamente correlacionados com os valores do ensaio de

hepcidina-25 LC/MS ($r=0,98$, $p<0,00001$), confirmando que o imunoensaio tipo sanduíche MSD mede especificamente e selectivamente hepcidina-25 em amostras de soro humano (dados não apresentados).

Vários parâmetros do imunoensaio tipo sanduíche MSD foram avaliados usando amostras de soro humanas. Mais especificamente, a estabilidade à congelação/descongelação foi avaliada testando quatro amostras diferentes de soro. Estes resultados mostraram que o imunoensaio tipo sanduíche MSD possui estabilidade à congelação e descongelação com 80-120% de recuperação consistente da hepcidina-25, mesmo após 5 ciclos de congelação-descongelação. Os resultados individuais dos ciclos de congelação/descongelação foram como se segue: amostra A - 0,16, 0,16, 0,17, 0,17, 0,17, e 0,17 mg/L respectivamente; amostra B - 4,5, 4,4, 4,6, 4,6, 4,6, e 4,4 mg/l respectivamente; amostra C - 8,9, 9,6, 9,7, 9,7, 9,9, e 9,6mg/l, respectivamente; e amostra D - 15,1, 15,1, 15,4, 15,7, 15,4 e 15,4 mg/l respectivamente. A precisão do imunoensaio tipo sanduíche MSD foi avaliada usando amostras de soro humano contendo 0,16, 4,5, e 15,1 mg/l de hepcidina-25 endógena. Os resultados de precisão intra-ensaio ($n = 20$) (CVs) foram 3,4%, 4,5% e 3,5%, respectivamente nos níveis acima, indicando precisão aceitável em todas as concentrações de hepcidina-25 testadas.

Para avaliar a recuperação da proteína hepcidina-25 sintetizada adicionada a soro humano, a proteína hepcidina-25 sintetizada foi adicionada a quatro amostras

de soro humano diferentes (cada uma delas contendo concentrações muito baixas de hepcidina-25 endógena) em concentrações de 250, 25, 2,5 e 0,25 µg/l respectivamente. Estas amostras foram analisadas usando o imunoensaio tipo sanduíche MSD. Os resultados da média (SD) foram 287 (6) µg/l, 24,2 (0,2) µg/l, 2,0 (0,1) µg/l e 0,23 (0,01) µg/L, respectivamente, indicando 80-120% de recuperação em todos os níveis de hepcidina-25 testados.

A gama normal do imunoensaio tipo sanduíche MSD foi estabelecida correndo 100 amostras de soro de voluntários saudáveis normais (50 do sexo masculino e 50 do sexo feminino). Os valores de hepcidina-25 nestas amostras variou entre <0,02 µg/l e 25 µg/l, com um valor médio de $3,0 \pm 0,5$ µg/l, consistente com os níveis de hepcidina-25 anteriormente descritos nos seres humanos normais usando os ensaios LC/MS (ver, Murphy, et al., Blood, 11 0:1048-54 (2007)).

É interessante que os níveis de hepcidina-25 em seres humanos normais são significativamente mais baixos nas mulheres ($p < 0,01$) ($1,8 \pm 0,4$ µg/l) comparativamente com os homens ($4,2 \pm 0,8$ µg/l). Os níveis de hepcidina-25 nestes indivíduos normais foram igualmente comparados com as concentrações de ferritina sérica e encontrou-se que estão directamente correlacionados com os níveis de ferritina sérica ($r = 0,71$, $p < 0,001$) (dados não apresentados).

Finalmente, os níveis de hepcidina-25 no soro de

doentes com cancro (n = 34) foram comparados com os níveis de hepcidina-25 no soro de voluntários saudáveis normais (n = 100), cada um deles determinado pelo imunoensaio tipo sanduíche MSD. Os resultados desta comparação demonstraram que os níveis de hepcidina-25 são significativamente elevados ($p < 0,001$) em doentes com cancro ($70,9 \pm 10,4 \mu\text{g/l}$) comparativamente com os controlos normais ($3,0 \pm 0,5 \mu\text{g/l}$) (dados não apresentados). É interessante que os grupos de doentes com doenças malignas hematológicas ($83,3 \pm 1,9 \mu\text{g/l}$) e não hematológicas ($58,4 \pm 17 \mu\text{g/l}$) cada um deles demonstrou níveis significativamente aumentados de hepcidina-25 comparativamente com controlos normais ($p < 0,001$ para ambos), sugerindo que níveis elevados de hepcidina-25 podem desempenhar um papel importante na anemia associada a cancro (dados não apresentados).

Comparativamente com os métodos de ELISA, os quais não são específicos para hepcidina-25 e podem reagir de forma cruzada com pro-hepcidina e com outras espécies de hepcidina não relevantes, o imunoensaio tipo sanduíche MSD aqui descrito mede especificamente e selectivamente níveis de hepcidina-25 em soro humano e está bem correlacionado com um método LC/MS padrão de excelência para hepcidina-25 anteriormente descrito. Uma vantagem do imunoensaio tipo sanduíche MSD relativamente a um método tipo LC/MS para medição de níveis séricos de hepcidina humana é que o imunoensaio tipo sanduíche MSD pode ser implementado na maioria dos laboratórios clínicos, os quais geralmente não têm o equipamento complexo nem o operador altamente

especializado necessário para realizar de rotina os ensaios tipo LC/MS. Ainda, o imunoensaio tipo sanduíche deverá ter o potencial para muito maior número de amostras que um ensaio LC/MS. Assim, o imunoensaio tipo sanduíche MSD proporciona um método que pode ser utilizado de rotina em clínica para selectivamente medir os níveis de hepcidina-25 em seres humanos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> ANTICORPOS SELECTIVOS ANTI-HEPCIDINA-25 E UTILIZAÇÕES DOS MESMOS

<130> X18122

<150> 61/086557

<151> 2008-08-06

<160> 90

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp	Thr	His	Phe	Pro	Ile	Cys	Ile	Phe	Cys	Cys	Gly	Cys	Cys	His	Arg
1				5					10					15	

Ser	Lys	Cys	Gly	Met	Cys	Cys	Lys	Thr
			20				25	

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 2

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Leu Phe Cys Cys Lys Cys Cys Lys Asn
1 5 10 15

Ser Ser Cys Gly Leu Cys Cys Ile Thr
20 25

<210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Lys Cys Cys Asn Asn
1 5 10 15

Ser Gln Cys Gly Ile Cys Cys Lys Thr
20 25

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> macaca sp.

<400> 4

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg
1 5 10 15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Arg Thr
20 25

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Construção sintética

<400> 5

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys
1 5

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa na posição 6 é Val ou Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa na posição 8 é Tyr ou Ser

<400> 6

Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Xaa	Ser	Xaa	Met	Tyr
1				5					10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa na posição 4 é Asn ou His

<400> 7

Leu	Thr	Ser	Xaa	Leu	Ala	Ser
1				5		

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa na posição 6 é Asn, Gly, ou Tyr

<400> 8

Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Xaa	Pro	Pro	Thr
1				5				

<210> 9

<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 9

Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr
1				5					10

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 10

Leu	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1				5		

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 11

Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Pro	Thr
1				5				

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 12

Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Tyr	Met	Tyr
1				5					10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 13

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 14

Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr
1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 15

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Met Tyr
1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 16

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa na posição 9 é Ser, Arg ou Pro

<400> 17

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Xaa	Asn	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Thr
1				5					10					15	

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa na posição 7 é Ser ou Pro

<400> 18

Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Xaa
1				5		

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na posição 1 é Val, His, Ile ou Phe

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa na posição 9 é Thr ou Val

<400> 19

Xaa Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Xaa
1 5

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 20

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 21

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 22

Val Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 23

His Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 24

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 25

Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro
1 5

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 26

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Pro Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 27

Ile Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 28

Phe Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Val
1 5

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa na posição 2 é Phe, Tyr ou Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa na posição 5 é Ser ou Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa na posição 6 é Thr ou Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa na posição 7 é Tyr ou Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa na posição 9 é Ile ou Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Xaa na posição 11 é Val ou Ile

<400> 29

Gly Xaa Ser Leu Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly
1 5 10

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa na posição 6 é Asp ou Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa na posição 7 é Ala ou Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa na posição 9 é Ser ou Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa na posição 13 é Ala ou Thr

<400> 30
His Ile Trp Trp Asn Xaa Xaa Lys Xaa Tyr Asn Thr Xaa Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa na posição 2 é Gly ou His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa na posição 6 é Ser ou Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa na posição 7 é Thr ou Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa na posição 8 é Ser, Ala ou Tyr

<400> 31
Ile Xaa Tyr Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Construção sintética

<400> 32
Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Ile Gly Val Gly
1 5 10

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 33
His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Ser Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 34
Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 35
Gly Tyr Ser Leu Ser Thr Pro Gly Ile Gly Val Gly
1 5 10

<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 36
His Ile Trp Trp Asn Asp Ala Lys Ser Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 37
Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ala Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 38
Gly Leu Ser Leu Ser Thr Pro Gly Ile Gly Val Gly
1 5 10

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 39

Gly	Phe	Ser	Leu	Asn	Ser	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ile	Gly
1				5					10		

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 40

His	Ile	Trp	Trp	Asn	Gly	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Thr	Thr	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 41

Ile	His	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Tyr	Gly	Phe	Ala	Tyr
1				5					10		

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 42

Gly	Phe	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	Asp	Met	Ser
1				5					10

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 43

Thr Ile Ile Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 44

Asp Gly Tyr Ile His
1 5

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 45

Ser Ala Ser Pro Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 46
<211> 106
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Construção sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa na posição 1 é Asp ou Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa na posição 3 é Leu ou Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa na posição 4 é Leu ou Met

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa na posição 5 é Thr ou Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa na posição 27 é Ser ou Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa na posição 29 é Val ou Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na posição 31 é Tyr ou Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (52)..(52)

<223> Xaa na posição 52 é Asn ou His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (59)..(59)

<223> Xaa na posição 59 é Ala ou Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (76)..(76)

<223> Xaa na posição 76 é Ser ou Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (93)..(93)

<223> Xaa na posição 93 é Asn, Tyr ou Gly

<400> 46

Xaa	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Gln	Ser	Pro	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Xaa	Ser	Xaa	Ser	Xaa	Met
		20						25					30		

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

Leu	Thr	Ser	Xaa	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Xaa	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Xaa Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Xaa Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na posição 1 é Glu ou Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é Lys ou Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa na posição 5 é Lys ou Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa na posição 6 é Gln ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa na posição 27 é Phe, Tyr ou Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa na posição 30 é Ser ou Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na posição 31 é Thr ou Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na posição 32 é Tyr ou Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> Xaa na posição 34 é Ile ou Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36)..(36)
<223> Xaa na posição 36 é Val ou Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Xaa na posição 43 é Ala ou Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(51)
<223> Xaa na posição 51 é Ala ou Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> Xaa na posição 57 é Asp ou Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> Xaa na posição 58 é Asn ou Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(60)
<223> Xaa na posição 60 é Ser o Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (64)..(64)
<223> Xaa na posição 64 é Ala ou Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> Xaa na posição 87 é Val ou Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(89)
<223> Xaa na posição 89 é Thr ou Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (90)..(90)
<223> Xaa na posição 90 é His ou Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(97)
<223> Xaa na posição 97 é Val ou Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa na posição 98 é Leu ou Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa na posição 100 é Gly ou His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (104)..(104)
 <223> Xaa na posição 104 é Ser ou Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (105)..(105)
 <223> Xaa na posição 105 é Thr ou Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106)..(106)
 <223> Xaa na posição 106 é Ser, Ala ou Tyr

<400> 47

Xaa	Val	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Xaa	Ser	Leu	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25					30		

Gly	Xaa	Gly	Xaa	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Xaa	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			

Trp	Leu	Xaa	His	Ile	Trp	Trp	Asn	Xaa	Xaa	Lys	Xaa	Tyr	Asn	Thr	Xaa
	50					55					60				

Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Asn	Asn	Gln	Val
65					70					75				80	

Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Xaa	Asp	Xaa	Xaa	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Xaa	Xaa	Ile	Xaa	Tyr	Tyr	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala
		115					120	

<210> 48
 <211> 106
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 48

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 49

<211> 122

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 49

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu .
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Ser Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr His Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Val Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 50

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 50

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met
20 25 30

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

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 51

<211> 122

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 51

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Tyr Ser Leu Ser Thr Pro
20 25 30

Gly Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Ala Lys Ser Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr His Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Val Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ala Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 52

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Pro Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 53

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 53

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met
20 25 30

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

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 54

<211> 122

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 54

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln

- 98 -

```
<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> Sequência artificial
```

<220>
<223> Construção sintética

<400> 55

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Met.
20 25 30

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

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 56
<211> 122
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 56

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr
20 25 30

Gly Phe Gly Ile Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Thr His Ile Trp Trp Asn Gly Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Thr
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Leu Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Leu Ile His Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na posição 32 é Ser, Arg ou Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (61)..(61)

<223> Xaa na posição 61 é Ser ou Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (94)..(94)

<223> Xaa na posição 94 é Val, His, Ile ou Phe

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (102)..(102)

<223> Xaa na posição 102 é Thr ou Val

<400> 57

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Ile	Gly
1				5					10					15	

Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Xaa
			20					25					30		

Asn	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Thr	Trp	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
	35						40					45			

Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Xaa	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75				80	

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

Ser	His	Phe	Pro	Trp	Xaa	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
			100					105					110		

<210> 58

<211> 114

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 58

Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1			5						10					15	

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Asp Gly Tyr Ile His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

<210> 59

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 59

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 60

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 60

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 61

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 61

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 62

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 62

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Pro
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 63
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 63
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Pro
 20 25 30
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Phe Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 64
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa na posição 1 é Asp ou Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é Leu ou Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa na posição 4 é Leu ou Met

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa na posição 5 é Thr ou Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa na posição 27 é Ser ou Pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa na posição 29 é Val ou Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa na posição 31 é Tyr ou Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa na posição 52 é Asn ou His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa na posição 59 é Ala ou Pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> Xaa na posição 76 é Ser ou Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (93)..(93)
 <223> Xaa na posição 93 é Asn, Tyr ou Gly

<400> 64

Xaa	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Gln	Ser	Pro	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Xaa	Ser	Xaa	Ser	Xaa	Met
		20						25					30		

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

Leu	Thr	Ser	Xaa	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Xaa	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				

Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Xaa	Met	Glu	Ala	Glu
65						70				75					80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Xaa Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 65

<211> 445

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na posição 1 é Glu ou Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é Lys ou Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa na posição 5 é Lys ou Val

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa na posição 6 é Gln ou Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> Xaa na posição 27 é Phe, Tyr ou Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa na posição 30 é Ser ou Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> Xaa na posição 31 é Thr ou Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> Xaa na posição 32 é Tyr ou Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> Xaa na posição 34 é Ile ou Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36)..(36)
<223> Xaa na posição 36 é Val ou Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Xaa na posição 43 é Ala ou Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(51)
<223> Xaa na posição 51 é Ala ou Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> Xaa na posição 57 é Asp ou Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> Xaa na posição 58 é Asn ou Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(60)
<223> Xaa na posição 60 é Ser ou Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (64)..(64)
 <223> Xaa na posição 64 é Ala ou Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (87)..(87)
 <223> Xaa na posição 87 é Val ou Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(89)
 <223> Xaa na posição 89 é Thr ou Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (90)..(90)
 <223> Xaa na posição 90 é His ou Asp

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(97)
 <223> Xaa na posição 97 é Val ou Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa na posição 98 é Leu ou Val

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa na posição 100 é Gly ou His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (104)..(104)
 <223> Xaa na posição 104 é Ser ou Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (105)..(105)
 <223> Xaa na posição 105 é Thr ou Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106)..(106)
 <223> Xaa na posição 106 é Ser, Ala ou Tyr

<400> 65

Xaa	Val	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln
1			5						10					15	

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Xaa	Ser	Leu	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25				30			

Gly	Xaa	Gly	Xaa	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Xaa	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			

Trp Leu Xaa His Ile Trp Trp Asn Xaa Xaa Lys Xaa Tyr Asn Thr Xaa
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Xaa Asp Xaa Xaa Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Xaa Xaa Ile Xaa Tyr Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 66

<211> 213

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 66

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 67

<211> 446

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 67

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Ser Tyr Asn Thr Ala
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr His Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Val Val Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Gly Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
 130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
 195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
 210 215 220

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 245 250 255

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 275 280 285

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 305 310 315 320

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
 340 345 350

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
 405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
 420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 68

<211> 213

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 68

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 69

<211> 446

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 69

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln

1	5	10	15
Thr Leu Ser	Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Tyr Ser Leu Ser Thr Pro		
	20	25	30
Gly Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu			
	35	40	45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Ala Lys Ser Tyr Asn Thr Ala			
	50	55	60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val			
	65	70	75
Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr His Thr Ala Thr Tyr Tyr			
	85	90	95
Cys Val Val Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ala Gly Phe Ala Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro			
	115	120	125
Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met			
	130	135	140
Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
	145	150	155
Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
	165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val			
	180	185	190
Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His			
	195	200	205
Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys			
	210	215	220
Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe			
	225	230	235
Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro			
	245	250	255

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
275 280 285

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
305 310 315 320

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
340 345 350

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 70

<211> 213

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 70

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly

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

<210> 71

<211> 213

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 71

Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Tyr	Met
			20					25					30		

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

Leu	Thr	Ser	His	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				

Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu
65					70					75					80

Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Gly	Pro	Pro	Thr
				85					90					95	

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro
			100					105					110		

Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly
		115					120					125			

Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn
		130				135					140				

Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Leu	Asn
145					150					155					160

Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser
				165					170					175	

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	Thr
			180					185					190		

Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Ser	Phe
		195					200					205			

Asn	Arg	Asn	Glu	Cys
				210

<210> 72
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Construção sintética

<400> 72

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Leu Ser Leu Ser Thr Pro
 20 25 30

Gly Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Ala Lys Ser Tyr Asn Thr Ala
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr His Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Val Val Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ala Gly Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
 130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
 195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
 210 215 220

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 245 250 255

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 275 280 285

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 305 310 315 320

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
 340 345 350

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
 405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
 420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 73

<211> 213

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 73

Asp	Ile	Gln	Met	Asn	Gln	Ser	Pro	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Met
			20					25					30		

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

Leu	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				

Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Met	Glu	Ala	Glu
65					70					75					80

Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr
				85					90					95	

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro
			100					105					110		

Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly
		115					120					125			

Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn
	130					135					140				

Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Leu	Asn
145				150						155					160

Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser
				165					170					175	

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	Thr
			180				185						190		

Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Ser	Phe
		195					200					205			

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 74

<211> 446

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 74

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr
20 25 30

Gly Phe Gly Ile Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Thr His Ile Trp Trp Asn Gly Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Thr
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Leu Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Leu Ile His Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro
115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
180 185 190

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 75
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Construção sintética

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa na posição 32 é Ser, Arg ou Pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (61)..(61)
 <223> Xaa na posição 61 é Ser ou Pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94)..(94)
 <223> Xaa na posição 94 é Val, His, Ile ou Phe

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (102)..(102)
 <223> Xaa na posição 102 é Thr ou Val

<400> 75

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Xaa
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Xaa Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

Ser His Phe Pro Trp Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 76

<211> 438

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 76

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

			85					90				95			
Ala	Asp	Asp	Gly	Tyr	Ile	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
			100					105					110		
Ser	Ala	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly
			115					120				125			
Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
			130				135				140				
Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu
145					150					155					160
Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr
				165					170					175	
Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu
			180					185					190		
Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp
			195				200					205			
Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr
			210			215					220				
Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
225					230				235						240
Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				245					250					255	
Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp
			260					265					270		
Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			275				280					285			
Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp
			290			295					300				
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro
305					310					315					320
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala
				325					330					335	

Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp
340 345 350

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile
355 360 365

Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn
370 375 380

Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys
385 390 395 400

Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
405 410 415

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu
420 425 430

Ser His Ser Pro Gly Lys
435

<210> 77

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 77

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

	85		90		95
Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	100		105		110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu	115		120		125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe	130		135		140
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg	145		150		155
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser	165		170		175
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu	180		185		190
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser	195		200		205
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys	210		215		

<210> 78
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 78

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

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 79

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 79

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys His Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 80

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Pro
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 81

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 81

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

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

<210> 82

<211> 215

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 82

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Arg	Val	Ser	Ser	Thr
		20						25					30		

Tyr	Leu	Phe	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
	35						40					45			

Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser	Pro	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				

Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70					75					80

Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Gly	Tyr	Pro
			85						90					95	

Phe	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
			100					105					110		

Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
		115					120					125			

Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
	130					135					140				

Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145					150					155					160

Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				165					170					175	

Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
			180					185					190		

Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
		195					200					205			

Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
	210					215

<210> 83
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 83

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Leu Ile Tyr
 20 25 30

Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asn Phe His Pro Tyr Leu Gly Val Thr Asn Tyr Val Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<211> 215

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 84

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Arg	Val	Ser	Ser	Thr
			20					25					30		

Tyr	Leu	Phe	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
		35					40					45			

Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				

Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70					75					80

Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Gly	Tyr	Pro
				85					90					95	

Phe	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
			100					105						110	

Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
		115					120					125			

Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
	130					135						140			

Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145					150					155					160

Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				165					170					175	

Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
			180					185					190		

Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
		195					200					205			

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 85

<211> 443

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 85

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Leu Ile Tyr
20 25 30

Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Phe His Pro Tyr Leu Gly Val Thr Asn Tyr Leu Glu Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Construção sintética

<400> 86
Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys
1 5

<210> 87
<211> 26
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 87
Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Gly Pro Gly Pro Gly Ile Ser Gln Ala
1 5 10 15

Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu
20 25

<210> 88
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met
1 5 10 15

Cys Cys Lys Thr
20

<210> 89
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 89

Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys
1 5 10 15

Gly Met Cys Cys Lys Thr
20

<210> 90

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

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

Gln Asp Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser Trp Met Pro Met Phe Gln Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly
35 40 45

Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
50 55 60

Lisboa, 1 de novembro de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo monoclonal que selectivamente se liga a hepcidina-25 humana consistindo na sequência de aminoácidos mostradas em SEQ ID NO:1, em que o anticorpo compreende seis CDRs seleccionadas do grupo consistindo em:

(i) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 32, 33 e 34, respectivamente;

(ii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 12, 13, 14, 35, 36 e 37, respectivamente;

(iii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 45, 13, 14, 35, 36 e 37, respectivamente;

(iv) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 12, 13, 14, 38, 36 e 37, respectivamente;

(v) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 15, 10, 16, 39, 40 e 41, respectivamente;

(vi) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 42, 43 e 44, respectivamente;

(vii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 20, 21, 23, 42, 43 e 44, respectivamente;

(viii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3

tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 24, 25, 23, 42, 43 e 44, respectivamente;

(ix) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 26, 25, 27, 42, 43 e 44, respectivamente;

(x) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 26, 25, 28, 42, 43 e 44, respectivamente;

(xi) LCDR1 tendo a sequência de aminoácidos SASSSX₁SX₂MY (SEQ ID NO:6), LCDR2 tendo a sequência de aminoácidos LTSX₃LAS (SEQ ID NO: 7), LCDR3 tendo a sequência de aminoácidos QQWSSX₄PPT (SEQ ID NO: 8), HCDR1 tendo a sequência de aminoácidos GX₉SLX₁₀X₁₁X₁₂GX₁₃GX₁₄G (SEQ ID NO: 29), HCDR2 tendo a sequência de aminoácidos HIWWNX₁₅SX₁₆KX₁₇YNTX₁₈LKS (SEQ ID NO: 30) e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos IX₁₉YYGX₂₀X₂₁X₂₂GFAY (SEQ ID NO: 31), em que X₁ é V ou A, X₂ é Y ou S, X₃ é N ou H, X₄ é N, G ou Y, X₉ é F, Y ou L, X₁₀ é S ou N, X₁₁ é T ou S, X₁₂ é Y ou P, X₁₃ é I ou F, X₁₄ é V ou I, X₁₅ é D ou G, X₁₆ é A ou N; X₁₇ é S ou Y, X₁₈ é A ou T, X₁₉ é G ou H, X₂₀ é S ou N, X₂₁ é T ou S, e X₂₂ é S, A ou Y; e

(xii) LCDR1 tendo a sequência de aminoácidos KSSQSLLYX₅NGKTYLT (SEQ ID NO: 17), LCDR2 tendo a sequência de aminoácidos LVSKLDX₆ (SEQ ID NO: 18), LCDR3 tendo a sequência de aminoácidos X₇QGSHPWXS (SEQ ID NO: 19), HCDR1 tendo a sequência de aminoácidos GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42), HCDR2 tendo a sequência de aminoácidos TIISGGTYTYPDSVKG (SEQ ID NO: 43), e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos DGYIH (SEQ ID NO: 44), em que X₅ é S, R ou P, X₆ é S ou P, X₇ é V, H, I ou F e X₅ é T ou V.

2. O anticorpo da reivindicação 1 em que o anticorpo se liga a hepcidina-25 humana consistindo na sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1 com um K_D entre cerca de 50 nM e cerca de 800 pM como determinado por ressonância plasmônica de superfície (SPR) a 25°C.

3. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-2 em que o anticorpo se liga a pro-hepcidina e hepcidina-20 humana com um K_D que é pelo menos cerca de 10 vezes superior àquele com que o anticorpo se liga a hepcidina-25 conforme determinado por SPR a 25°C.

4. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-3 em que o anticorpo se liga a hepcidina-22 humana com um K_D superior a cerca de 200 nM como determinado por SPR a 25°C.

5. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-4 que ainda se liga a hepcidina-25 de murganho e/ou rato (SEQ ID NOs: 3 e 2, respectivamente, com um K_D inferior a cerca de 500 nM como determinado por SPR a 25°C.

6. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-5, em que o anticorpo é um fragmento de anticorpo que compreende a porção de ligação ao antígeno e retém a capacidade de ligação ao antígeno.

7. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações

cações 1-6 que compreende um polipéptido da região variável da cadeia leve (LCVR) e um polipéptido da região variável da cadeia pesada (HCVR) em que:

(i) os polipéptidos de LCVR e de HCVR possuem as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 48 e 49, respectivamente;

(ii) os polipéptidos LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra e SEQ ID NOs: 50 e 51, respectivamente;

(iii) os polipéptidos LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 52 e 51, respectivamente;

(iv) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 53 e 54, respectivamente;

(v) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 55 e 56, respectivamente;

(vi) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 59 e 58, respectivamente;

(vii) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOS: 60 e 58, respectivamente;

(viii) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 53 e 54, respectivamente;

(ix) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 62 e 58, respectivamente; ou

(x) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 63 e 58, respectivamente;

(xi) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 46 e 47, respectivamente;

(xii) as LCVR e HCVR tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 57 e 58, respectivamente.

8. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-7 que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve tendo (i) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: (i) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 67 e 66, respectivamente; (ii) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 69 e 68, respectivamente; (iii) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 69 e 70, respectivamente; (iv) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 72 e 71, respectivamente, (v) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 74 e 73, respectivamente, (vi) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 76 e 77, respectivamente; (vii) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 76 e 78, respectivamente; (viii) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 76 e 79, respectivamente; (ix) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 76 e 80, respectivamente; ou (x) as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID Nos: 76 e 81, respectivamente.

9. Uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-8 em combinação com um ou mais veículo, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

10. Um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-8 para usar em terapia.

11. Um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-8 para usar no tratamento ou prevenção de anemia.

12. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-8 para usar num método para aumentar os níveis séricos de ferro, a contagem de reticulócitos, a contagem de eritrócitos, a hemoglobina e/ou o hematócrito num ser humano.

13. Um método para detecção da proteína hepcidina-25 numa amostra biológica, compreendendo incubação de um anticorpo que selectivamente se liga a hepcidina-25 humana com uma amostra biológica em condições e durante um tempo suficiente para permitir que o referido anticorpo se ligue à proteína hepcidina-25 e detecção da referida ligação, em que o anticorpo compreende seis CDRs, seleccionadas do grupo consistindo em:

(i) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3

tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOS: 20, 21, 22, 42, 43 e 44, respectivamente;

(ii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOS: 26, 25, 27, 42, 43 e 44, respectivamente; e

(iii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOS: 20, 21, 23, 42, 43 e 44, respectivamente.

14. Um método para quantificação da quantidade da proteína hepcidina-25 numa amostra de tecido ou fluido biológico compreendendo;

(i) revestimento de um suporte sólido com (a) um primeiro anticorpo que compreende seis CDRs seleccionadas do grupo consistindo em:

1) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOS: 20, 21, 22, 42, 43, e 44, respectivamente;

2) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOS: 20, 21, 23, 42, 43 e 44, respectivamente;

3) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOS: 24, 25, 23, 42, 43 e 44, respectivamente;

4) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOS: 26, 25, 27, 42, 43 e 44, respectivamente; e

5) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 26, 25, 28, 42, 43 e 44, respectivamente; ou (b) um primeiro anticorpo que se liga a um epitopo contido dentro do aminoácidos 5 a 25, inclusive, de SEQ ID NO:1;

(ii) aplicação da amostra ao suporte sólido revestido com o referido anticorpo;

(iii) remoção da amostra não ligada;

(iv) se o primeiro anticorpo no passo (i) for (a), aplicação ao suporte sólido de um segundo anticorpo que se liga a um epitopo contido nos aminoácidos 5 a 25, inclusive, de SEQ ID NO:1 ou se o primeiro anticorpo no passo (i) for (b), aplicação ao suporte sólido de um segundo anticorpo que compreende seis CDRs seleccionadas do grupo consistindo em:

1) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 42, 43 e 44, respectivamente;

2) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 20, 21, 23, 42, 43 e 44, respectivamente;

3) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 e HCDR3 tendo a sequência de aminoácidos como se mostra em SEQ ID Nos: 24, 25, 23, 42, 43 e 44, respectivamente;

4) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 26, 25, 27, 42, 43 e 44, respectivamente; e

5) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, e HCDR3 tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em SEQ ID NOs: 26, 25, 28, 42, 43 e 44, respectivamente;

(v) remoção do segundo anticorpo não ligado; e

(vi) detecção da quantidade de hepcidina-25 ligada ao segundo anticorpo na referida amostra quantitativamente, semi-quantitativamente ou qualitativamente.

15. O método da reivindicação 14 em que o anticorpo que se liga a um epitopo contido nos aminoácidos 5 a 25, inclusive, de SEQ ID NO:1 compreende uma LCVR e uma HCVR tendo as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 84 e 85.

16. O método de qualquer uma das reivindicações 14-15 em que apenas o primeiro ou o segundo anticorpo é marcado com um grupo detectável.

17. O método de qualquer uma das reivindicações 14-16 em que a referida detecção é indirecta.

18. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 14-17 em que a referida amostra é sangue, plasma, soro, urina, fluido cefalorraquidiano (CSF), líquido amniótico, saliva, suor, líquido ascítico, linfa, fluido quístico, leite, fluido de ferida ou derivados e em que a referida amostra contacta com o referido anticorpo num imunoensaio enzimático (EIA), ELISA, um ensaio ELISA tipo sanduíche, radioimunoensaio, uma reacção de precipitação ou um imunoensaio fluorescente.

19. Um estojo ("kit") para detecção ou quantificação de hepcidina-25 compreendendo o anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-8.

Lisboa, 1 de novembro de 2013

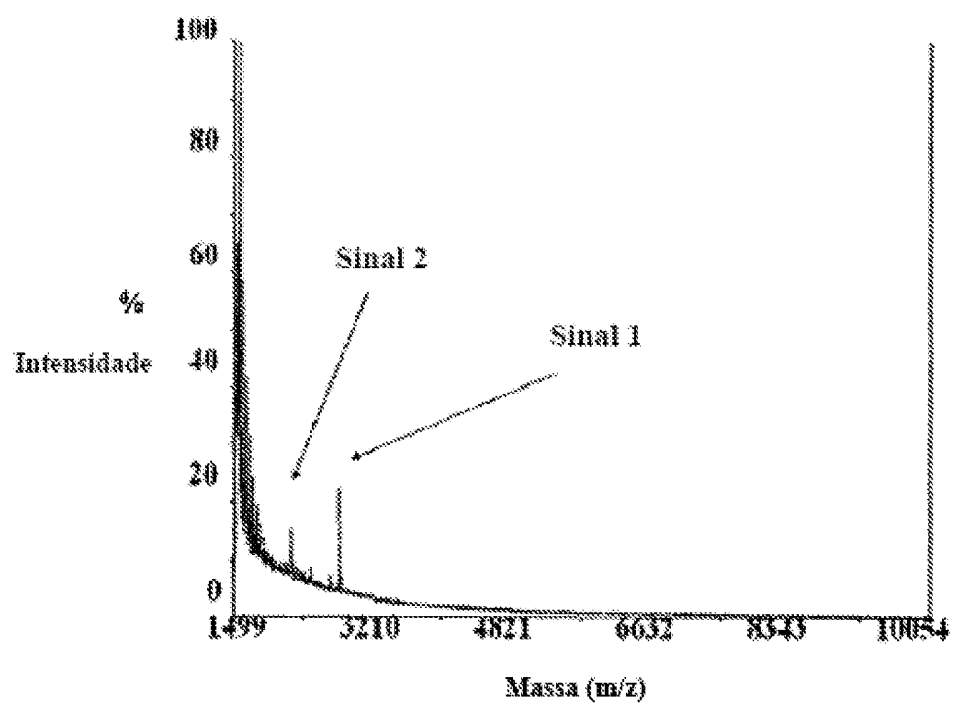


Figura 1

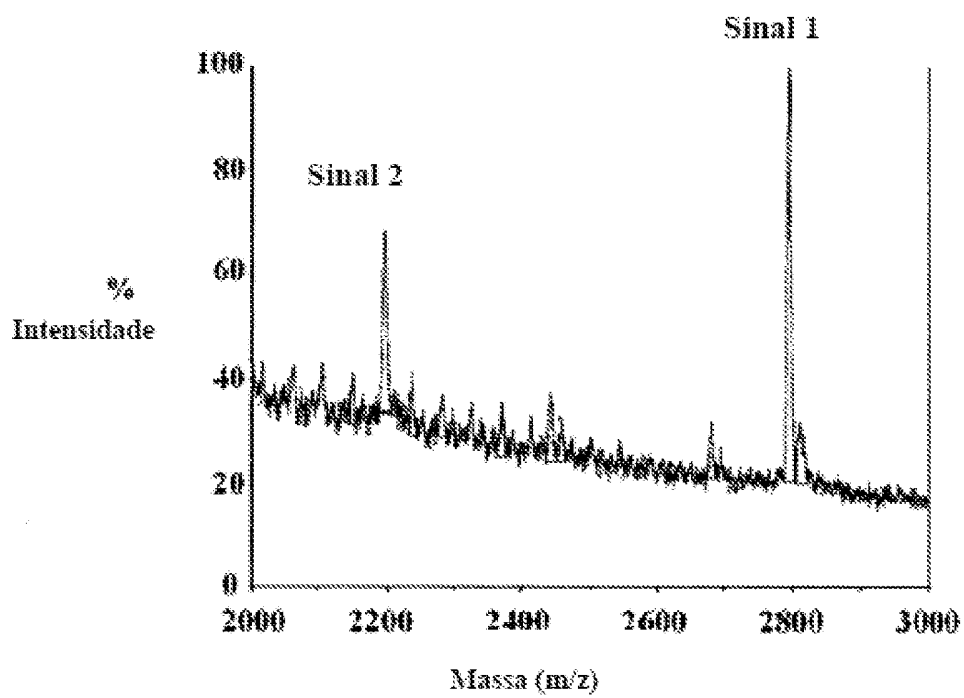


Figura 2

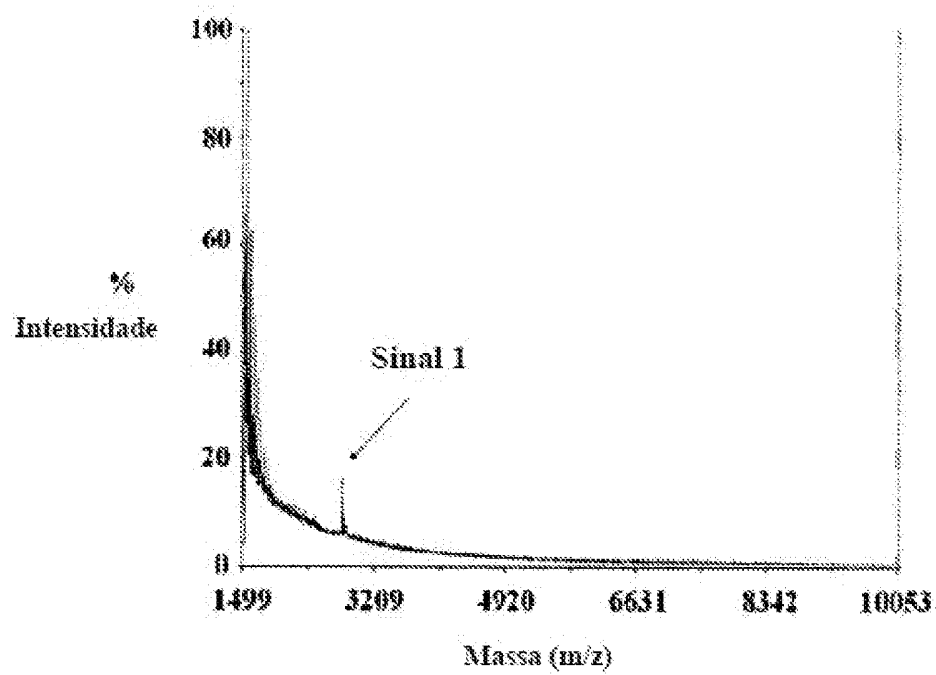


Figura 3

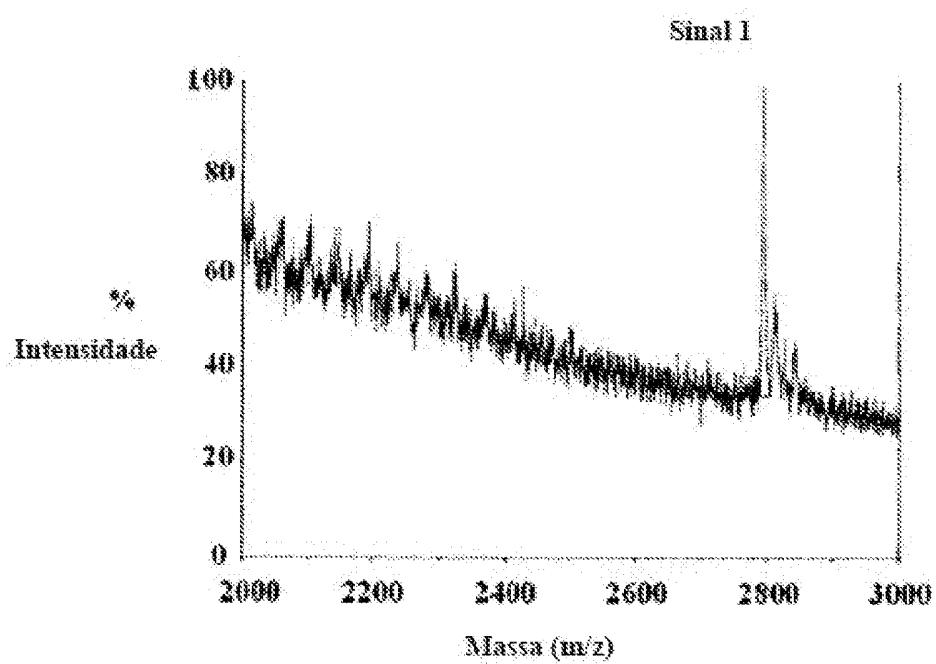


Figura 4

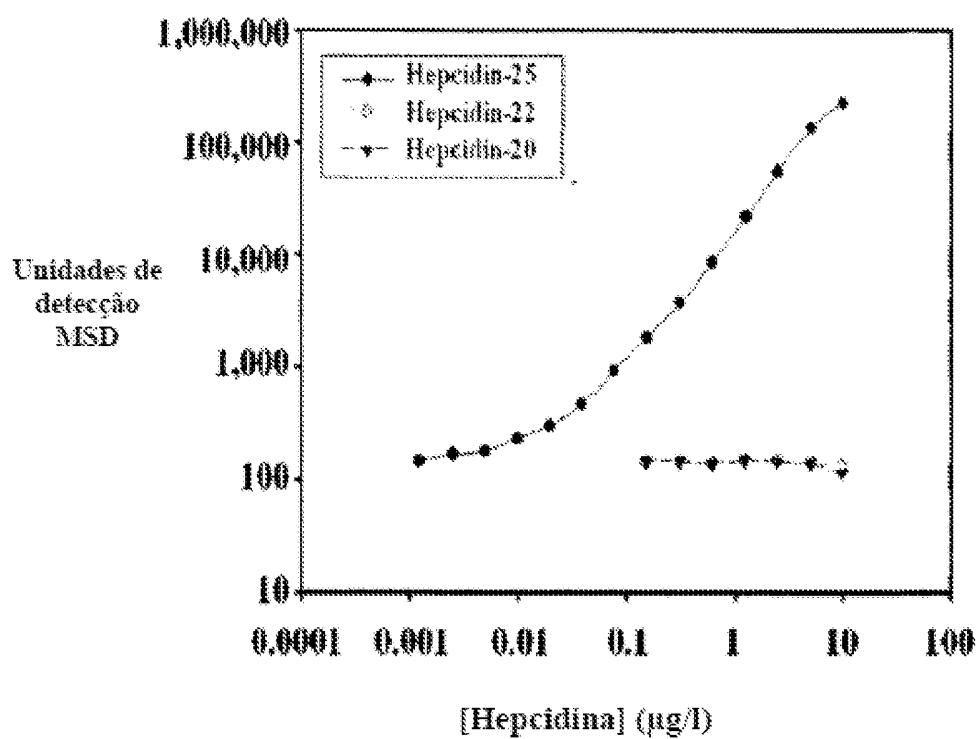


Figura 5

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 20060019339 A
- US 20070224186 A
- US 20080213277 A
- WO 2006062685 PCT
- WO 2005005604 A
- WO 200606046835 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- KEMNA, E.H. et al. *Haematologica*, 2008, vol. 93(1), 90-7
- ROEMER, A. et al. *Br J Nutr.*, 2007, vol. 97, 544-9
- LUUKKONEN S.; PUNNONEN K. *Clin Chem Lab Med.*, 2006, vol. 44, 1361-2
- GUTIERREZ, J.A. et al. *BioTechniques*, 2005, vol. 38, S13-S17
- MURPHY et al. *Blood*, 2007, vol. 110, 1048-54
- KEMNA, E.H. et al. *Clin. Chem.*, 2007, vol. 53, 620-8
- KABAT. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. National Institutes of Health, 1991
- PLUCKTHUN. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315
- JAYASENA, S.D. *Clin. Chem.*, 1999, vol. 45, 1628-50
- FELLOUSE, F.A. et al. *J. Mol. Biol.*, 2007, vol. 373 (4), 924-40
- NEMETH, E. et al. *Hepcidin Regulates Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization*. *Science*, 2004, vol. 306, 2090-2093
- QUEEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 2869
- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327
- VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534
- WATKINS, J. et al. *Biochem.*, 1997, vol. 253, 37-45
- WATKINS, J. et al. *Anal. Biochem.*, 1996, vol. 256, 169-177
- SPARBIER, K. *International Meeting of the Association of Biomolecular Resource Facilities*, 2006