

(11) Número de Publicação: **PT 1434791 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 5/00 (2007.10) **C07K 1/00** (2007.10)
C07K 14/00 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.10.11**

(30) Prioridade(s): **2001.10.11 US 328624 P**
2002.09.27 US 414155 P
2002.10.10 US 269695

(43) Data de publicação do pedido: **2004.07.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.10.07**
251/2009

(73) Titular(es):

AMGEN, INC.
ONE AMGEN CENTER DRIVE THOUSANDS
OAKS, CA 91320-1799 **US**

(72) Inventor(es):

HOSUNG MIN **US**
JONATHAN DANIEL OLINER **US**

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **AGENTES DE LIGAÇÃO ESPECÍFICOS DA ANGIOPOIETINA-2 HUMANA**

(57) Resumo:

RESUMO**"AGENTES DE LIGAÇÃO ESPECÍFICOS DA ANGIOPOIETINA-2 HUMANA"**

A invenção descreve péptidos que se ligam a Ang-2. A invenção descreve também peptícorpos que compreendem os péptidos, métodos para a preparação de tais péptidos e peptícorpos e métodos de tratamento utilizando tais péptidos e peptícorpos.

DESCRIÇÃO

"AGENTES DE LIGAÇÃO ESPECÍFICOS DA ANGIOPOIETINA-2 HUMANA"

Este pedido beneficia dos direitos do pedido provisório de patente de invenção norte-americana com o n°. de série 60/328 624 depositado a 11 de Outubro de 2001.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a agentes de ligação específicos que reconhecem as angiopoietinas-2 (Ang-2) e se ligam a elas. Mais concretamente, a invenção diz respeito à produção, utilização para diagnóstico e utilização terapêutica dos agentes de ligação específicos e seus fragmentos que se ligam especificamente a Ang-2.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A angiogénese, que é a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos existentes, é essencial para muitos processos fisiológicos e patológicos. Normalmente, a angiogénese é estritamente regulada por factores pró-angiogénicos e anti-angiogénicos, mas no caso de doenças como o cancro, doenças neovasculares oculares, artrite e psoríase, o processo pode falhar. Folkman, J., Nat. Med., 1: 27-31 (1995).

Há inúmeras doenças que se sabe que estão associadas à angiogénese desregulada ou indesejada. Tais doenças compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, a neovascularização ocular, por exemplo, as retinopatias (incluindo a retinopatia diabética), a degeneração macular relacionada com a idade, psoríase, hemangioblastoma,

hemangioma, arteriosclerose, doença inflamatória, por exemplo, a doença inflamatória reumatóide ou reumática, especialmente a artrite (incluindo a artrite reumatóide), ou outras patologias inflamatórias crónicas, tais como asma crónica, aterosclerose arterial ou pós-transplante, endometriose e doenças neoplásicas, por exemplo, os chamados tumores sólidos e os tumores líquidos (ou hematopoiéticos) (tais como leucemias e linfomas). Há outras doenças associadas à angiogénese indesejada que são evidentes para os especialistas na matéria.

Embora haja muitos sistemas de transdução de sinais implicados na regulação da angiogénese, um dos sistemas melhor caracterizados e mais selectivo das células endoteliais está associado ao receptor com actividade tirosina-cinase Tie-2 (designado por "Tie-2" ou "Tie-2R" (também conhecido por "ORK"); o Tie-2 dos murinos também é conhecido por "tek") e aos seus ligandos, as angiopoietinas (Gale, N. W. e Yancopoulos, G. D., *Genes Dev.* 13: 1055-1066 [1999]). São conhecidas 4 angiopoietinas: desde a angiopoietina-1 ("Ang-1") até à angiopoietina-4 ("Ang-4"). Estas angiopoietinas também são conhecidas pela designação de "ligandos de Tie-2". (Davis, S., *et al.*, *Cell*, 87: 1161-1169 [1996]; Grosios, K., *et al.*, *Cytogenet Cell Genet*, 84: 118-120 [1999]; Holash, J., *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42: 1617-1625 [1999]; Koblizek, T. I., *et al.*, *Current Biology*, 8: 529-532 [1998]; Lin, P., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 8829-8834 [1998]; Maisonpierre, P. C., *et al.*, *Science*, 277: 55-60 [1997]; Papapetropoulos, A., *et al.*, *Lab Invest*, 79: 213-223 [1999]; Sato, T. N., *et al.*, *Nature*, 375: 70-74 [1998]; Shyu, K. G., *et al.*, *Circulation*, 98: 2081-2087

[1998]; Suri, C., *et al.*, *Cell*, 87: 1171-1180 [1996]; Suri, C., *et al.*, *Science*, 282: 468-471 [1998]; Valenzuela, D. M., *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96: 1904-1909 [1999]; Witzenbichler, B., *et al.*, *J Biol Chem*, 273: 18514-18521 [1998]). Enquanto a ligação de Ang-1 ao Tie-2 estimula a fosforilação do receptor em células endoteliais criadas em cultura, observou-se que a Ang-2 agoniza e antagoniza a fosforilação do receptor Tie-2 (Davis, S., *et al.*, [1996], *supra*; Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], *supra*; Kim, I., J. H. Kim, *et al.*, *Oncogene* 19 (39): 4549-4552 (2000); Teichert-Kuliszewska, K., P. C. Maisonpierre, *et al.*, *Cardiovascular Research* 49(3): 659-70 (2001)).

Os fenótipos de ratinhos com inativações (*knockouts*) de Tie-2 e Ang-1 são semelhantes e sugerem que a fosforilação de Tie-2 estimulada por Ang-1 desempenha um papel mediador na remodelação e estabilização de vasos em desenvolvimento *in utero* mediante a manutenção da adesão de células de suporte a células endoteliais (Dumont, D. J., *et al.*, *Genes & Development*, 8: 1897-1909 [1994]; Sato, T. N., *et al.*, *Nature*, 376: 70-74 [1995]; Suri, C., *et al.*, [1996], *supra*). Admite-se que a função de Ang-1 na estabilização dos vasos sanguíneos seja conservada nos adultos, onde é expressa ampla e constitutivamente (Hanahan, D., *Science*, 277: 48-50 [1997]; Zagzag, D., *et al.*, *Experimental Neurology*, 159: 391-400 [1999]). Pelo contrário, a expressão de Ang-2 está essencialmente limitada aos locais de remodelação vascular, onde se presume que bloqueie a função de Ang-1, induzindo assim um estado de plasticidade vascular que pode conduzir à angiogénese (Hanahan, D., [1997], *supra*; Holash, J., *et*

al., Science, 284: 1994-1998 [1999]; Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], *supra*).

Numerosos estudos já publicados demonstraram conclusivamente a expressão de Ang-2 selectiva dos vasos em estado patológicos associados à angiogénese. Estes estados patológicos compreendem, por exemplo, psoríase, degeneração macular e cancro (Bunone, G., *et al.*, American Journal of Pathology, 155: 1967-1976 [1999]; Etoh, T., *et al.*, Cancer Research, 61: 2145-2153 [2001]; Hangai, M., *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42: 1617-1625 [2001]; Holash, J., *et al.*, [1999] *supra*; Kuroda, K., *et al.*, Journal of Investigative Dermatology, 116: 713-720 [2001]; Otani, A., *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40: 1912-1920 [1999]; Stratmann, A., *et al.*, American Journal of Pathology, 153: 1459-1466 [1998]; Tanaka, S., *et al.*, J Clin Invest, 103: 34-345 [1999]; Yoshida, Y., *et al.*, International Journal of Oncology, 15: 1221-1225 [1999]; Yuan, K., *et al.*, Journal of Periodontal Research, 35: 165-171 [2000]; Zagzag, D., *et al.*, [1999] *supra*). A maior parte destes estudos incidiu sobre o cancro, observando-se que há muitos tipos de tumores que parecem manifestar a expressão de Ang-2 vascular. Contrariamente à sua expressão na angiogénese patológica, a expressão de Ang-2 em tecidos normais é extremamente limitada (Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], *supra*; Mezquita, J., *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 260: 492-498 [1999]). No adulto normal, os três locais principais de angiogénese são o ovário, a placenta e o útero; estes são os tecidos principais em tecidos normais (isto é, não cancerosos) em que foi detectado ARNm de Ang-2 .

Determinados estudos funcionais sugerem que a Ang-2 pode estar implicada na angiogénese tumoral. Ahmad *et al.* (Cancer Res., 61: 1255-1259 [2001]) descrevem a sobreexpressão de Ang-2 e demonstraram que está aparentemente associada a um aumento do desenvolvimento tumoral num modelo de xenoinxerto em murganhos. Ver também Etoh *et al.*, *supra*, e Tanaka *et al.*, *supra*, em que são apresentados dados que associam indubitavelmente a sobreexpressão de Ang-2 à hipervascularidade tumoral, no entanto, pelo contrário, Yu *et al.* (Am. J. Path., 158: 563-570 [2001]) apresentam dados que mostram que a sobreexpressão de Ang-2 em células do carcinoma pulmonar de Lewis e em células do carcinoma mamário TA3 prolongou significativamente a sobrevivência de murganhos injectados com os transfectantes correspondentes.

Nos últimos anos foram publicados vários estudos que sugerem que Ang-1, Ang-2 e/ou Tie-2 como alvos possíveis para a terapêutica contra o cancro. Por exemplo, cada uma das patentes de invenção norte-americanas n^{os} 6 166 185, 5 650 490 e 5 814 464 descreve o conceito dos anticorpos anti-ligando de Tie-2 e dos corpos receptores. Lin *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 8829-8834 [1998]) injectaram um adenovírus que expressa Tie-2 solúvel em murganhos; o Tie-2 solúvel diminui significativamente o número e o tamanho dos tumores desenvolvidos pelos murganhos. Num estudo congénere, Lin *et al.* (J. Clin. Invest., 100: 2072- 2078 [1997]) injectaram uma forma solúvel de Tie-2 em ratos; este composto reduziu significativamente o tamanho dos tumores nos ratos. Siemeister *et al.* (Cancer Res., 59: 3185-3189 [1999]) geraram linhagens celulares de melanoma humano que

expressam o domínio extracelular de Tie-2, injectaram estas linhagens celulares em murganhos atímicos e concluíram que o Tie-2 produziu de acordo com o observado uma "inibição significativa" do desenvolvimento tumoral e da angiogénese tumoral. À luz desta informação, e tendo em conta que tanto a Ang-1 como a Ang-2 se ligam ao Tie-2, não se pode concluir, indubitavelmente, a partir destes estudos se Ang-1, Ang-2 ou Tie-2 poderia ser um alvo atractivo para a terapêutica contra o cancro.

A fusão de determinados péptidos numa proteína estável no plasma, tal como uma região constante de Ig, para melhorar o período de semi-vida destas moléculas está descrita, por exemplo, na publicação do PCT com o nº WO 00/24782, publicada a 4 de Maio de 2000.

A fusão de uma proteína, ou de um seu fragmento, numa proteína plasmática estável, tal como uma região constante de Ig, para melhorar o período de semi-vida destas moléculas foi já objecto de diversas descrições (ver, por exemplo, a patente de invenção norte-americana nº 5 480 981; Zheng *et al.*, J. Immunol., 154: 5590-5600, (1995); Fisher *et al.*, N. Engl. J. Med., 334: 1697-1702, (1996); Van Zee, K. *et al.*, J. Immunol., 156: 2221-2230, (1996); a patente de invenção norte-americana nº 5 808 029, de 15 de Setembro de 1998; Capon *et al.*, Nature, 337: 525-531, (1989); Harvill *et al.*, Immunotech., 1: 95-105, (1995); o documento WO 97/23614, publicado a 3 de Julho de 1997; o documento PCT/US 97/23183, depositado a 11 de Dezembro de 1997; Linsley, J. Exp. Med., 174: 561-569, (1991); o documento WO 95/21258, publicado a 10 de Agosto de 1995).

O documento WO 00/57901 diz respeito à administração de um activador do receptor de TIE2 ou de um anticorpo

neutralizador anti-Ang-2 para diminuir ou inibir perdas de plasma num mamífero.

Uma terapêutica eficaz anti-Ang-2 poderia beneficiar uma vasta população de pacientes com cancro uma vez que a maior parte dos tumores sólidos necessitam de neovascularização para crescerem até diâmetros para além de 1-2 milímetros. Uma terapêutica deste tipo poderia ter também uma aplicação mais alargada em outras doenças associadas à angiogénese, tais como as retinopatias, artrite e psoríase.

Há uma necessidade ainda pouco desenvolvida no sentido de se identificar novos agentes que especificamente reconheçam e se liguem a Ang-2. Tais agentes poderiam ser úteis para o rastreio de diagnóstico e para a intervenção terapêutica em estados patológicos associados à actividade de Ang-2.

Posto isto, constitui um objecto da presente invenção proporcionar agentes de ligação específicos de Ang-2 que modulem a actividade de Ang-2. Tais agentes da presente invenção assumem a forma de peptícorpos, isto é, péptidos fundidos com outras moléculas, tais como um domínio Fc de um anticorpo, em que o radical peptídico se liga especificamente a Ang-2.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objecto, de acordo com uma variante, os péptidos (também aqui designados por polipéptidos) que compreendam pelo menos uma sequência de aminoácido seleccionada entre o conjunto constituído por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 76 a SEQ ID NO: 118 inclusive, em que o referido polipéptido é capaz de se

ligar a Ang-2. Também estão abrangidas na presente invenção as variantes e derivados de tais péptidos e os seus sais fisiologicamente aceitáveis.

De acordo com uma outra variante, os péptidos e seus derivados e variantes da presente invenção são acoplados a veículos, sendo o referido polipéptido de fusão capaz de se ligar a Ang-2.

De acordo com uma outra variante, os péptidos podem ser fundidos com domínios Fc, assim se obtendo peptícorpos. Os peptícorpos compreendem pelo menos um péptido, por exemplo, os de sequências seleccionadas entre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 76 a SEQ ID NO: 118, e também os seus derivados e variantes. Além disso, os péptidos podem compreender pelo menos um péptido de acordo com as fórmulas explicitadas em SEQ ID NO: 65 a SEQ ID NO: 75 e SEQ ID NO: 158.

Ainda de acordo com uma outra variante, a invenção proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codificam os polipéptidos específicos da invenção e seus derivados e variantes.

Ainda de acordo com mais outra variante, a invenção proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codificam os peptícorpos e também os seus derivados e variantes. Facultativamente, tais moléculas de ácidos nucleicos compreendem as de SEQ ID NO: 33 a SEQ ID NO: 53.

Ainda de acordo com mais uma outra variante, a invenção pode ser utilizada num método para inibir o desenvolvimento tumoral, administrando uma quantidade eficaz dos polipéptidos específicos da presente invenção a um paciente que disso necessite. A invenção pode ser utilizada num método de inibição da angiogénese num

paciente, o qual consiste em administrar uma quantidade eficaz dos agentes de ligação específicos da presente invenção a um paciente que disso necessite. A invenção também é útil num método para tratar o cancro num paciente, o qual consiste em administrar uma quantidade eficaz dos agentes de ligação específicos da presente invenção a um paciente que disso necessite.

A invenção também diz respeito a um polipéptido da invenção capaz de se ligar à Ang-2, em que o polipéptido compreende a sequência de aminoácidos **WDPWT** (SEQ ID NO: 65) e em que o polipéptido tem um comprimento entre 5 e 50 aminoácidos, e também diz respeito aos seus sais fisiologicamente aceitáveis. O polipéptido também pode compreender a sequência de aminoácidos:

WDPWTC

(SEQ ID NO: 66)

e seus sais fisiologicamente aceitáveis. Adicionalmente, o polipéptido pode compreender a sequência de aminoácidos:

Cz²WDPWT

(SEQ ID NO: 67)

em que o símbolo z² representa um resíduo aminoácido polar ácido ou neutro e seus sais fisiologicamente aceitáveis. O polipéptido pode compreender ainda a sequência de aminoácidos:

Cz²WDPWTC

(SEQ ID NO: 68)

em que o símbolo z² representa um resíduo aminoácido polar ácido ou neutro e seus sais fisiologicamente aceitáveis.

De acordo com uma outra variante, a invenção diz respeito a um polipéptido capaz de se ligar a Ang-2,

compreendendo uma sequência de aminoácidos de fórmula geral:



(SEQ ID NO: 69)

em que:

cada um dos símbolos a^1 , a^2 e a^3 representa independentemente um resíduo aminoácido;

o símbolo a^5 representa um resíduo aminoácido;

o radical a^{12} está ausente ou representa um resíduo aminoácido;

o radical a^{13} está ausente ou representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico;

o símbolo a^{14} representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

e seus sais fisiologicamente aceitáveis. De acordo com uma variante preferencial:

o símbolo a^1 representa V, I, P, W, G, S, Q, N, E, K, R ou H;

o símbolo a^2 representa V, P, M, G, S, Q, D, E, K, R ou H;

o símbolo a^3 representa A, V, P, M, F, T, G, D, E, K ou H;

o símbolo a^8 representa A, V, G, Q, N, D ou E;

o símbolo a^{12} representa S, Q, N, D, E, K ou R;

o símbolo a^{13} representa L, T H e

o símbolo a^{14} representa V, L, I, W ou M.

De acordo com uma variante mais preferencial, o símbolo a^1 representa Q; o símbolo a^2 representa E; o símbolo a^3 representa E; o símbolo a^5 representa D ou E; o símbolo a^{12} representa D ou E; o símbolo a^{13} representa H e o símbolo a^{14} representa M.

Faz-se observar que a utilização aqui presente de letras minúsculas com índices sobrepostos (tal como em a^1 e b^1) serve para identificar as posições dos aminoácidos e que não servem para indicar as abreviaturas de uma só letra para um dado aminoácido. As abreviaturas de aminoácidos através de uma só letra são aqui indicadas por letras maiúsculas.

A invenção também diz respeito a um polipéptido capaz de se ligar a Ang-2, compreendendo uma sequência de aminoácidos de fórmula geral:



(SEQ ID NO: 70)

em que:

o radical b^1 está ausente ou representa um resíduo aminoácido;

o radical b^2 está ausente ou representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico;

cada um dos radicais b^3 , b^4 , b^5 e b^6 ou está ausente ou representa independentemente um resíduo aminoácido;

o símbolo b^8 representa um resíduo aminoácido;

o radical b^{15} está ausente ou representa um resíduo aminoácido;

o radical b^{16} está ausente ou representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico;

o radical b^{17} está ausente ou representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

cada um dos radicais b^{18} , b^{19} e b^{20} ou está ausente ou representa independentemente um resíduo aminoácido;

e seus sais fisiologicamente aceitáveis. De acordo com uma variante preferida:

o radical b^1 está ausente ou representa A, V, L, P, W, F, T, G, S, Q, N, K, R ou H;

o radical b^2 está ausente ou representa A, V, L, I, P, W, M, T, G, S, Y, N, K, R ou H;

o radical b^3 está ausente ou representa A, L, I, P, W, M, T, G, S, Q, N, E, R ou H;

o símbolo b^4 representa V, I, P, W, G, S, Q, N, E, K, R ou H;

o símbolo b^5 representa V, P, M, G, S, Q, D, E, K, R ou H;

o símbolo b^6 representa A, V, P, M, F, T, G, D, E, K ou H;

o símbolo b^8 representa A, V, G, Q, N, D ou E;

o símbolo b^{15} representa S, Q, N, D, E, K ou R;

o símbolo b^{16} representa L, T ou H;

o símbolo b^{17} representa V, L, I, W ou M;

o radical b^{18} está ausente ou representa A, V, L, P, W, F, T, G, Y, Q, D, E ou R;

o radical b^{19} está ausente ou representa V, L, I, P, T, G, S, Y, Q, N, D, E ou R e

o radical b^{20} está ausente ou representa V, L, P, W, M, T, G, S, Y, Q, N, D, K ou R.

De acordo com uma variante mais preferencial, o radical b^1 está ausente ou representa P ou T; o radical b^2 está ausente ou representa I ou N; o radical b^3 está ausente ou representa R ou I; o símbolo b^4 representa Q; o símbolo b^5 representa E; o símbolo b^6 representa E; o símbolo b^8 representa D ou E; o símbolo b^{15} representa D ou E; o símbolo b^{16} representa H; o símbolo b^{17} representa M; o radical b^{18} está ausente ou representa W ou P; o radical b^{19}

está ausente ou representa G ou E e o radical b^{20} está ausente ou representa V ou K.

Faz-se observar também que a invenção diz respeito preferencialmente a um polipéptido que compreende pelo menos uma sequência de aminoácidos seleccionada entre o conjunto constituído por SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 76 a SEQ ID NO: 118, inclusive, em que o polipéptido é capaz de se ligar a Ang-2 e também aos seus sais fisiologicamente aceitáveis. As sequências peptídicas são as explicitadas adiante:

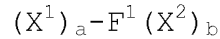
QUADRO 1

PÉPTIDO	SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
Con4-44	76	PIRQEECDWDPWTCEHMWEV
Con4-40	77	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV
Con4-C5	80	AATQEECEWDPWTCEHMPRS
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD
Con4-35	82	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG
Con4-43	83	SISHEECEWDPWTCEHMQVG
Con4-49	84	WAAQEECEWDPWTCEHMGRM
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST
Con4-48	86	GHSQEECGWDPWTCEHMGTS
Con4-46	87	QHWQEECEWDPWTCDHMPSK
Con4-41	88	NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR
Con4-36	89	KSGQVECNWDPWTCEHMPRN
Con4-34	90	VKTQEHCDWDPWTCEHMREW
Con4-28	91	AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM
Con4-39	92	PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM

(continuação)

PÉPTIDO	SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
Con4-25	93	RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK
Con4-50	94	HGQNMECEWDPWTCEHMFY
Con4-38	95	PRLQEECVWDPWTCEHMPLR
Con4-29	96	RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ
Con4-47	97	QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS
Con4-20	98	QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL
Con4-45	99	WAQQEECAWDPWTCDHMVGL
Con4-37	100	LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS
Con4-33	101	PMNQVECDWDPWTCEHMPRS
AC2-Con4	102	FGWSHGCEWDPWTCEHMGST
Con4-32	103	KSTQDDCDWDPWTCEHMVGP
Con4-17	104	GPRICTCQWDPWTCEHMDQL
Con4-8	105	STIGDMCEWDPWTCAHMQVD
AC4-Con4	106	VLGGQGCWDPWTCRLLQGW
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG
Con4-C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG
Con4-21	109	TKGKSVCQWDWTCSHMQSG
Con4-C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG
Con4-18	111	WVNEVVCEWDPWTCTNHWDTP
Con4-19	112	VVQVGMCQWDPWTCKHMLQ
Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR
Con4-C4	115	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCQHLYT
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMQG
TN8-Con4*	4	QEECEWDPWTCEHM
* Faz-se observar que determinados péptidos e/ou peptícorpos podem conter os prefixos "TN", "TN8" ou "TN12" e que tais prefixos podem estar ou não presentes num determinado peptícorpo. Assim, por exemplo, os termos "TN8-Con4" e "Con4" são aqui utilizados intermutavelmente.		

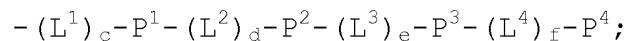
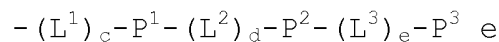
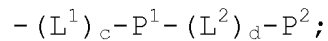
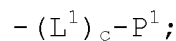
De acordo com uma outra variante, a invenção diz respeito a uma composição de matéria que possui a seguinte fórmula geral:



e seus multímeros, em que:

o símbolo F^1 representa um veículo;

cada um dos radicais X^1 e X^2 é seleccionado independentemente entre



em que um ou vários dos radicais P^1 , P^2 , P^3 e P^4 compreendem independentemente um polipéptido tal como aqui descrito. Por exemplo, de acordo com uma variante preferencial, cada um dos radicais P^1 , P^2 , P^3 e P^4 pode compreender independentemente um polipéptido de sequências seleccionadas entre SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:76 a SEQ ID NO: 118.

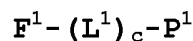
De acordo com uma outra variante, a composição de matéria possui a fórmula geral:



ou



e seus sais fisiologicamente aceitáveis, em que os símbolos X^1 , F^1 e X^2 possuem as significações aqui definidas. De acordo com uma outra variante, a composição de matéria possui a fórmula geral:



e seus sais fisiologicamente aceitáveis, em que os símbolos L^1 , F^1 e P^1 possuem as significações aqui definidas. De

acordo com uma outra variante, a composição de matéria possui a fórmula geral:

$$\mathbf{F}^1 - (\mathbf{L}^1)_c - \mathbf{P}^1 - (\mathbf{L}^2)_d - \mathbf{P}^2$$

e seus sais fisiologicamente aceitáveis, em que os símbolos $\mathbf{L}^1$, $\mathbf{F}^1$, $\mathbf{P}^1$, $\mathbf{P}^2$ e c e d possuem as significações aqui definidas. Ainda de acordo com uma outra variante, a composição de matéria possui a fórmula geral:

$$\mathbf{P}^1 - (\mathbf{L}^1)_c - \mathbf{F}^1 - (\mathbf{L}^2)_d - \mathbf{P}^2$$

e seus sais fisiologicamente aceitáveis. De acordo com uma variante preferida, o símbolo $\mathbf{F}^1$ representa um domínio $\mathbf{F}_c$ ou um seu fragmento.

De acordo com uma variante ainda mais preferida, a invenção diz respeito a uma composição de matéria que possui a fórmula geral:

$$(\mathbf{X}^1)_q - \mathbf{F}^1 - (\mathbf{X}^2)_r$$

e seus multímeros, em que;

o símbolo $\mathbf{F}^1$ representa um veículo;

cada um dos radicais $\mathbf{X}^1$ e $\mathbf{X}^2$ é seleccionado independentemente entre

$$- (\mathbf{L}^1)_s - \mathbf{P}^1;$$

$$- (\mathbf{L}^1)_s - \mathbf{P}^1 - (\mathbf{L}^2)_t - \mathbf{P}^2;$$

$$- (\mathbf{L}^1)_s - \mathbf{P}^1 - (\mathbf{L}^2)_t - \mathbf{P}^2 - (\mathbf{L}^3)_u - \mathbf{P}^3 \text{ e}$$

$$- (\mathbf{L}^1)_s - \mathbf{P}^1 - (\mathbf{L}^2)_t - \mathbf{P}^2 - (\mathbf{L}^3)_u - \mathbf{P}^3 - (\mathbf{L}^4)_v - \mathbf{P}^4;$$

em que um ou vários dos radicais $\mathbf{P}^1$, $\mathbf{P}^2$, $\mathbf{P}^3$ e $\mathbf{P}^4$ compreendem independentemente um polipéptido seleccionado entre o conjunto constituído por:

(a) a sequência de aminoácidos WDPWT (SEQ ID NO:65), em que o referido polipéptido tem um comprimento entre 5 e 50 aminoácidos;

(b) a sequência de aminoácidos WDPWTC (SEQ ID NO:66);

(c) a sequência de aminoácidos Cz²WDPWT (SEQ ID NO:67), em que o símbolo z² representa um resíduo aminoácido polar, ácido ou neutro;

(d) a sequência de aminoácidos Cz²WDPWTC (SEQ ID NO:68); em que o símbolo z² representa um resíduo aminoácido polar, ácido ou neutro;

(e) a sequência de aminoácidos Pc²Dc⁴Lc⁶c⁷c⁸LY (SEQ ID NO:71), em que o símbolo c² representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro; o símbolo C⁴ representa A, D ou E; o símbolo C⁶ representa um resíduo aminoácido; o símbolo c⁷ representa um resíduo aminoácido e o símbolo c⁸ representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico;

(f) a sequência de aminoácidos RPe³e⁴e⁵e⁶e⁷G (SEQ ID NO:73), em que o símbolo e³ representa um aminoácido polar neutro; o símbolo e⁴ representa um resíduo aminoácido ácido; o símbolo e⁵ representa um resíduo aminoácido polar neutro ou ácido; o símbolo e⁶ representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro e o símbolo e⁷ representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro;

(g) a sequência de aminoácidos Cg²Cg⁴g⁵DPFTg¹⁰GCg¹³ (SEQ ID NO: 75), em que o símbolo g² representa um resíduo aminoácido ácido; o símbolo g⁴ representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro; o símbolo g⁵ representa um resíduo aminoácido polar neutro ou ácido; o símbolo g¹⁰ representa um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro e o símbolo g¹³ representa um resíduo ácido;

(i) um polipeptídeo de SEQ ID NO:2;
em que cada um dos símbolos L¹, L², L³ e L⁴ representa independentemente um *linker*; e cada um dos símbolos q, r, s, t, u e v representa independentemente 0 ou 1, com a

condição de pelo menos um dos símbolos q e r representar 1; e seus sais fisiologicamente aceitáveis.

Faz-se observar que a invenção também diz respeito a um polipéptido de fusão compreendendo pelo menos um péptido definido tal como aqui descrito, e um veículo, em que o polipéptido de fusão é capaz de se ligar a Ang-2, e seus sais fisiologicamente aceitáveis. No polipéptido de fusão, o veículo é preferencialmente pelo menos um domínio Fc, polietileno-glicol, um lípido, um grupo colesterol, um hidrato de carbono e um oligossacarídeo. Há outros veículos adequados, tais como a albumina e semelhantes, que são bem conhecidos pelos especialistas na matéria e que se considera aqui abrangidos no âmbito da invenção.

Um especialista na matéria sabe que há diversas moléculas que podem ser inseridas na estrutura dos agentes de ligação específicos. Assim, é possível inserir uma determinada molécula, por exemplo, entre as porções péptido e veículo dos agentes de ligação específicos, ou pode ser inserida na própria porção peptídica, conservando simultaneamente a actividade desejada do agente de ligação específico. É possível inserir facilmente, por exemplo, moléculas tais como um domínio Fc ou um seu fragmento, polietileno-glicol ou outras moléculas congêneres, tais como o dextrano, um ácido gordo, um lípido, um grupo colesterol, um hidrato de carbono de molécula pequena, um péptido, um agente citotóxico, um agente quimioterapêutico, um radical detectável, conforme aqui descrito (incluindo agentes fluorescentes, radiomarcadores, tais como os radioisótopos), um oligossacarídeo, oligonucleótidos, um polinucleótido, ARN de interferência (ou de outro tipo), enzimas, hormonas ou semelhantes. Há outras moléculas

adequadas para inserção de acordo com esta metodologia e que são perfeitamente conhecidas pelos especialistas na matéria e que se considera aqui abrangidas no âmbito da invenção. Isto compreende, por exemplo, a inserção de uma molécula desejada entre dois aminoácidos consecutivos, facultativamente unidos por um *linker* conveniente. A título de exemplo, na sequência do peptícorpo Con4(C):

M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:23)

um especialista na matéria poderia inserir facilmente uma molécula desejada, por exemplo, entre os dois resíduos glutamina adjacentes ("QQ") para conseguir obter uma estrutura e/ou uma função desejadas, conservando simultaneamente a aptidão do péptido para se ligar a Ang-2. Assim, a sequência poderia ser modificado do modo seguinte:

M-Fc-GGGGGAQ-**[molécula]**-QEECEWDPWTCEHIVILE.

Se desejado, é possível acrescentar moléculas *linker* convenientes. Faz-se observar também que a molécula pode ser inserida em inúmeras localizações na molécula, incluindo as cadeias laterais adequadas, entre o veículo e a sequência peptídica, do modo seguinte:

M-Fc-**[molécula]**-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE

ou em qualquer outra localização desejada por um especialista na matéria. Há outras variantes adequadas que serão evidentes para os especialistas na matéria.

De acordo com uma outra variante, a invenção diz respeito a um polinucleótido que codifica os agentes de ligação específicos (incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os péptidos e/ou os peptícorpos) da invenção, conforme aqui descrito. Faz-se observar aos especialistas na matéria que no caso de a sequência de aminoácidos ser conhecida, é possível determinar facilmente

as sequências nucleotídicas correspondentes recorrendo a técnicas consagradas. Ver, por exemplo, Suzuki, D., An Introduction to Genetic Analysis, W.H. Freeman Pub. Co. (1986). Seguidamente estão indicadas sequências nucleotídicas exemplificativas, que codificam péptidos da invenção. Um especialista na matéria sabe que há mais do que um codão para codificar um determinado aminoácido e consequentemente a invenção diz respeito a qualquer sequência nucleotídica que codifique os péptidos e/ou os peptícorpos da invenção.

Péptido	Seq. Id. No.	Sequência peptídica	Sequência de ADN exemplificativa
Con4-44	76	PIRQEEDWDPWTCEHMWEV	ccgatacgtcaggaagaatgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgtgggaagt (SEQ ID NO: 159)
Con4-40	77	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK	accacatccaggagaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgccgggtaas (SEQ ID NO: 160)
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV	tggtaagaacaggacgttcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggctgaagt (SEQ ID NO: 161)
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV	aaccgtctgcaggagaattgcga tgggacccgtggacctgcgaac catggaaacgtt (SEQ ID NO: 162)
Con4-C5	80	AATQEECBWDPWTCEHMPRS	gcigtaccaggagaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgccgcgttc (SEQ ID NO: 163)
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD	ctgcgtaccaggagaattgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgttcgactgg (SEQ ID NO: 164)

(continuação)

Péptido	Seq. Id. No.	Sequência peptídica	Sequência de ADN exemplificativa
Con4-35	82	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG	gttcgcgcgcagaaagactgcga atggggaccctgggaactgcgaac acatgtacgttgg (SEQ ID NO: 165)
Con4-43	83	SISHEECEWDPWTCEHMQVG	tccatctccacgaagaatgcga tgggaccctgggaactgcgaaca catgcaggttgg (SEQ ID NO: 360)
Con4-49	84	WAAQEECEWDPWTCEHMGRM	tggcctgcacaggaagaatgcga atgggatccctgggaactgcgaaca catgggtcgtatg (SEQ ID NO: 166)
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST	acttggcgcgcaggacaaatgcga atgggatccctgggaactgcgaaca catgggttctact (SEQ ID NO: 167)
Con4-48	86	GHSQEECGWDPWTCEHMGTS	ggtcactccagggaagaatgcgg tgggaccctgggaactgcgaac acatgggtacgtcc (SEQ ID NO: 168)
Con4-46	87	QHWQEECEWDPWTCDHMPSK	cagcactggcaggaagaatgcga atgggaccctgggaactgcgaacc acatgcctccaaa (SEQ ID NO: 169)
Con4-41	88	NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR	aacgttcgtcaggaanaatgcga tgggaccctgggaactgcgaaca catgccggttcgt (SEQ ID NO: 170)
Con4-36	89	KSGQVECNWDPWTCEHMPRN	aaatccggtcagggtgaatgcaac tgggaccctgggaactgcgaaca catgccgcgtaac (SEQ ID NO: 171)
Con4-34	90	VKTQEHCDWDPWTCEHMREW	gttaaaaccagggaacactgcga ctgggaccctgggaactgcgaac acatgcgtgaatgg (SEQ ID NO: 172)
Con4-28	91	AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM	gcttggggtcaggaagggtgcga ctgggaccctgggaactgcgaac acatgctgcgatg (SEQ ID NO: 173)

(continuação)

Péptido	Seq. Id. No.	Sequência peptídica	Sequência de ADN exemplificativa
Con4-39	92	PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM	ccggtaaccagggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgcgcgcgatg (SEQ ID NO: 174)
Con4-25	93	RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK	cgtagctccgcagggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgcgc acatggacatcaa (SEQ ID NO: 175)
Con4-50	94	HGQNMECEWDPWTCEHIVIFRY	cacggtcagaaacatggaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggtccgttac (SEQ ID NO: 176)
Con4-38	95	PRLQEECVWDPWTCEHMPLR	ccgcgctcgcagggaagaatgcgtt tgggacccgtggacctgcgaaca catgcccgtcgcgt (SEQ ID NO: 177)
Con4-29	96	RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ	cgtaccaccagggaataatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggaatccag (SEQ ID NO: 178)
Con4-47	97	QTSQEDCVWDPWTCDHMOVSS	cagacctccagggaagactgcgtt tgggacccgtggacctgcgaaca catggttctccc (SEQ ID NO: 179)
Con4-20	98	QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL	cagggtatcgggicgtccgtgcgaa tgggacccgtggacctgcgaaca cctggaaggctcg (SEQ ID NO: 180)
Con4-45	99	WAQQEECAWDPWTCDHMOVGL	tggcctcagcagggaagaatgcgc tgggacccgtggacctgcgacc acatgggtggctcg (SEQ ID NO: 181)
Con4-37	100	LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS	ctgccgggtcagggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggttcgttcc (SEQ ID NO: 182)
Con4-33	101	PMNQVECDWDPWTCEHMPRS	ccgatgaaccagggtgaatgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgcgcgcgtcc (SEQ ID NO: 183)

(continuação)

Péptido	Seq. Id. No.	Sequência peptídica	Sequência de ADN exemplificativa
AC2-Con4	102	FGWSHGCEWDPWTCEHMGST	ttcgggttggtctcacgggtgcgaat gggatccgtggacttgcgaacac atgggttctacc (SEQ ID NO: 184)
Con4-32	103	KSTQDDCDWDPWTCEHMGVP	aaatccaccacaggacgactgcga ctgggaacccgtggacctgcgaac acatgggttggtccg (SEQ ID NO: 185)
Con4-17	104	GPRISTCQWDPWTCEHMDQL	ggtcgcgtatctccacctgccag tgggacccgtggacctgcgaaca catggaccagctg (SEQ ID NO: 186)
Con4-8	105	STIGDMCEWDPWTCAHMQVD	tcaccatcggtgacatgtgcgaa tgggacccgtggacctgcgctca catgcagggtgac (SEQ ID NO: 187)
AC4-Con4	106	VLGGQGCWDPWTCRLIQGW	gttcgggttggtcagggtgcgaa tgggacccgtggacctgcgctg ctgcagggttgg (SEQ ID NO: 188)
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG	gttcgggttggtcagggtgccag tgggacccgtggacctgcctcca ccctggaagacggt (SEQ ID NO: 189)
Con4-C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG	accaccalcggttccatgtgccag tgggacccgtggacctgcgctca catgcagggttgg (SEQ ID NO: 190)
Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG	accaaaggtaaatccgttgccag tgggacccgtggacctgcctcca catgcagtccggt (SEQ ID NO: 191)
Con4-C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG	accaccalcggttccatgtgccag tgggacccgtggacctgcgctca catgcagggttgg (SEQ ID NO: 192)
Con4-18	111	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP	tgggttaacgaagtgttgcgaat gggacccgtggacctgcgaaccac tgggacaccccg (SEQ ID NO: 193)

(continuação)

Péptido	Seq. Id. No.	Sequência peptídica	Sequência de ADN exemplificativa
Con4-19	112	VVQVGMQWDPWTCKHMLQ	gtgttcaggttggtatgtgccagt gggacctgtggacctgcacacac atgcgtctgcag (SEQ ID NO: 194)
Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV	gctgttggttccagacctgcgaat gggacctgtggacctgcgtcac ctgggtgaagt (SEQ ID NO: 195)
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR	cagggtatgaaatgttctgcgaat gggacctgtggacctgcgtcac atcgtttaccgt (SEQ ID NO: 196)
Con4-C4	115	TTIGSMQWDPWTCEHMQGG	accacctatgggttcctgtgccag tgggacctgtggaacctgcgaaca catgcagggtgtgt (SEQ ID NO: 197)
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCQHLTYT	acctccagcgtgtgtgtgcgaat gggacctgtggacctgcgcacac ctgacctacacc (SEQ ID NO: 198)
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS	cagtgtgtcctggccgccgtgcga atgggacctgtggacctgcgcaga ccgtttggccgtcc (SEQ ID NO: 199)
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMQG	ggtaacctccccgtccttctgccagt gggacctgtggacctgtctccac atgttccagggt (SEQ ID NO: 200)
TN8-Con4	4	QEECEWDPWTCEHM	caggagaatgcgaatgggacct atggacttgcgascacatg (SEQ ID NO: 201)

Ainda de acordo com uma outra variante, a invenção diz respeito a vectores de expressão que compreendem pelo menos um polinucleótido da invenção. De acordo com mais outra variante, a invenção diz respeito a células hospedeiras que compreendem um vector de expressão. Faz-se observar que as células hospedeiras são preferencialmente células

procarióticas (tais como as células de *E. coli*) ou células eucarióticas.

A invenção também diz respeito a uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de uma composição do tipo aqui descrito, misturada com um veículo farmaceuticamente aceitável.

A invenção também diz respeito a polipéptidos da invenção utilizáveis para inibir a angiogénese indesejada num mamífero, consistindo isso em administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido ou de uma composição conforme aqui descrito. A invenção também diz respeito aos polipéptidos da invenção utilizáveis na modulação da angiogénese num mamífero, consistindo isso em administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido ou de uma composição conforme aqui descrito. A invenção diz respeito ainda aos polipéptidos da invenção utilizáveis para a inibição do desenvolvimento tumoral, caracterizada pela angiogénese indesejada num mamífero, consistindo isso em administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido ou de uma composição conforme aqui descrito. Complementarmente, a invenção diz respeito aos polipéptidos da invenção utilizáveis no tratamento de cancro num mamífero, consistindo isso em administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido ou de uma composição conforme aqui descrito e um agente quimioterapêutico. De acordo com uma variante preferencial, o agente quimioterapêutico é pelo menos um dos compostos 5-FU, CPT-11 e Taxotere. No entanto, faz-se observar que também é possível utilizar outros agentes

quimioterapêuticos convenientes e praticar outras terapias contra o cancro.

A invenção também diz respeito aos polipéptidos da invenção utilizáveis para modular pelo menos quer a permeabilidade vascular quer as perdas de plasma num mamífero, consistindo isso em administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipéptido ou de uma composição conforme aqui descrito. A invenção ainda diz respeito aos polipéptidos da invenção utilizáveis para tratar pelo menos uma patologia seleccionada entre doença neovascular ocular, obesidade, hemangioblastoma, arteriosclerose, doença inflamatória, patologias inflamatórias, aterosclerose, endometriose, patologias neoplásicas, doenças ósseas ou psoríase, num mamífero, consistindo isso em administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipéptido ou de uma composição conforme aqui descrito.

Faz-se observar que os agentes de ligação específicos da invenção podem ser utilizados para tratar diversas doenças associadas à angiogénese desregulada ou indesejada. Tais doenças compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, a neovascularização ocular, por exemplo, retinopatias (incluindo retinopatia diabética e degeneração macular associada à idade), psoríase, hemangioblastomas, hemangiomas, arteriosclerose, doenças inflamatórias, tais como as doenças inflamatórias reumatóides ou reumáticas, em especial a artrite (incluindo a artrite reumatóide) ou outras doenças inflamatórias crónicas, tais como a asma crónica, aterosclerose arterial ou pós-transplante, endometriose e doenças neoplásicas, por exemplo, os chamados tumores sólidos e os tumores líquidos

(tais como as leucemias). Outras doenças que possam ser tratadas mediante a administração dos agentes de ligação específicos irão ser evidentes para os especialistas na matéria. Tais doenças suplementares compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, a obesidade, a permeabilidade vascular, as perdas de plasma e as patologias ósseas, incluindo a osteoporose. Assim sendo, a invenção também diz respeito a polipéptidos e composições utilizáveis em métodos para tratar tais doenças associadas à angiogénese desregulada ou indesejada.

Há outras variantes da invenção que serão facilmente evidentes a partir do texto subsequente aqui apresentado.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DAS FIGURAS

A figura 1 mostra um gráfico de volume tumoral (eixo y) em função do tempo (eixo x) num murganho portador de tumor A-431, tratado com o peptícorpo TN8-Con4-C da presente invenção, ou com soluto salino tamponado com fosfato (PBS). Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 2 representa um gráfico da concentração de peptícorpo (eixo y) em função do tempo decorrido após a dose (eixo x) em murganhos de tipo natural tratados com uma dose de 50 µg de qualquer dos peptícorpos 2xCon4-C, L1-7-N ou L1-21-N. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 3 representa um gráfico de volume tumoral (eixo y) em função do tempo num murganho portador de tumor A-431, tratado com o peptícorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção, ou com soluto salino tamponado com fosfato (PBS) ou com peptícorpo de controlo. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 4 ilustra um gráfico que representa o crescimento *in vitro* de células A431 criadas em cultura e tratadas com o peptícorpo Con4-C de acordo com a presente invenção, com o peptícorpo de controlo ou não tratadas. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 5 representa um gráfico de volume tumoral (eixo y) em função do tempo (eixo x) em células tumorais Colo205 tratadas com peptícorpo Con4-C, peptícorpo L1-7-N, peptícorpo L1-21-N ou com peptícorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção, ou com soluto salino tamponado com fosfato (PBS), anticorpo anti-Ang-2 (Ab536) ou Fc. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 6 representa um gráfico de volume tumoral (eixo y) em função do tempo (eixo x) em murganhos portadores do tumor de xenoenxerto de Colo205, tratados com doses variáveis de peptícorpo 2xCon4-C, de acordo com a presente invenção, ou com soluto salino tamponado com fosfato (PBS) ou com Fc. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 7 representa um gráfico de volume tumoral (eixo y) em função do tempo (eixo x) em murganhos portadores do tumor de xenoenxertia de Colo205, tratados com o peptícorpo 2xCon4-C, de acordo com a invenção, ou com os peptícorpos de controlo. A figura 7 também representa um gráfico de área contrastada com CD31/área tumoral total para estes peptícorpos. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 8 representa um gráfico de volume tumoral (eixo y) em função do tempo (eixo x) em murganhos portadores do tumor de xenoenxerto de Colo205, tratados com o peptícorpo 2xCon4-C, de acordo com a presente invenção,

ou com soluto salino tamponado com fosfato (PBS) ou com um peptícorpo de controlo. Os pormenores estão descritos nos exemplos. Este gráfico mostra que os peptícorpos anti-Ang-2 são capazes de inibir o desenvolvimento do tumor Colo205 independentemente do momento em que comece o doseamento.

A figura 9 ilustra um resumo dos índices de resposta completa (RC) obtidos em fêmeas de murgancho pelado, utilizando o anticorpo Ab536 ou utilizando o peptícorpo 2xCon4-C, nos dois modelos xenoinxerto com A431 e Colo-205. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 10A representa um gráfico de volume tumoral (eixo y) em função do tempo (eixo x) em murganchos portadores do tumor de xenoinxertia de Colo205, tratados com o peptícorpo 2xCon4-C, de acordo com a presente invenção, ou com uma combinação de 2xCon4-C e taxotere, ou com soluto salino tamponado com fosfato (PBS), ou com PBS mais taxotere. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 10B representa um gráfico de volume tumoral (eixo y) em função do tempo (eixo x) em murganchos portadores do tumor de xenoinxerto de Colo205, tratados com o peptícorpo 2xCon4-C, de acordo com a presente invenção, ou com uma combinação de 2xCon4-C e 5-FU, ou com soluto salino tamponado com fosfato (PBS), ou com PBS mais 5-FU. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 11A representa um gráfico dos níveis de aumento do volume das patas (ASC±DP) no modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos tratados com o peptícorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção, ou com soluto salino tamponado com fosfato (PBS), ou com o peptícorpo de controlo, ou com substâncias de controlo normais ou artríticas. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 11B representa um gráfico de densidade mineral dos ossos da pata (DMO) num modelo de artrite induzida pelo adjuvante em ratos tratados com o 2xCon4-C de acordo com a presente invenção, ou com soluto salino tamponado com fosfato (PBS), ou com peptícorpo de controlo, ou com substâncias de controlo normais ou artríticas. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 11C representa um gráfico de variação da massa corporal num modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos tratados com peptícorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção, ou com soluto salino tamponado com fosfato (PBS), ou com peptícorpo de controlo, ou com substâncias de controlo normais ou artríticas. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 12 representa dois gráficos que ilustram a inibição da angiogénese corneal induzida por VEGF em ratos. O primeiro gráfico ilustra o número de vasos sanguíneos medidos em ratos tratados com albumina do soro de bovino (BSA), VEGF mais soluto salino tamponado com fosfato (PBS) ou VEGF mais peptícorpo Con4-C da invenção. O segundo gráfico ilustra a área dos vasos sanguíneos (mm^2) em ratos tratados com BSA, VEGF mais soluto salino tamponado com fosfato (PBS) ou com VEGF mais peptícorpo Con4-C da invenção. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

As figuras 13A, 13B e 13C ilustram os dados de mapeamento de epítomos (D. O. 370) para a Ang-2 humana de comprimento completo (hAng-2), para o terminal N de hAng-2 e para o terminal C de hAng-2, respectivamente para os peptícorpos TN8-Con4-C, L1-7-N e 12-9-3-C de acordo com a invenção, e também para os peptícorpos de controlo Tie2-Pc, C2B8 ou 5B 12. Os pormenores estão descritos nos exemplos.

A figura 14 ilustra a afinidade de ligação (K_D) do peptícorpo 2xCon-4-C de acordo com a invenção, recorrendo para tal ao ensaio "Sapidyne KinExA". Os pormenores estão descritos nos exemplos.

DESCRIÇÃO MINUCIOSA DA INVENÇÃO

Os cabeçalhos das diversas secções são aqui utilizados apenas para fins organizacionais e não se pretende com isso qualquer limitação aos assuntos aqui descritos.

Podem ser utilizadas todas as técnicas convencionais para a produção de moléculas de ADN recombinante, proteínas e anticorpos e também para as culturas de tecidos e para a transformação de células. As reacções enzimáticas e as técnicas de purificação são realizadas tipicamente em conformidade com as especificações do fabricante ou conforme é vulgarmente praticado na especialidade, recorrendo a procedimentos convencionais, tais como os descritos por Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1989]), ou conforme aqui descrito. A não ser que sejam apresentadas aqui definições concretas, a nomenclatura aqui utilizada e os processos e técnicas laboratoriais da química analítica, da química orgânica sintética e da química médica e farmacêutica aqui descritos são os vulgarmente utilizados e perfeitamente conhecidos na especialidade. É possível recorrer a técnicas convencionais para as sínteses químicas, análises químicas, preparações farmacêuticas, formulações, administração e tratamento de pacientes.

Definições

Os termos utilizados ao longo desta memória descritiva são definidos a seguir, salvo quando isso esteja limitado em casos concretos.

O termo "Ang-2" refere-se ao polipéptido explicitado na figura 6 da patente de invenção norte-americana nº 6 166 185 ("Tie-2 ligando-2") ou seus fragmentos e também aos polipéptidos congêneres que compreendam variantes alélicas, variantes de junção, derivados, variantes obtidas por substituição, deleção e/ou inserção, péptidos e polipéptidos de fusão e homólogos inter-espécies. O polipéptido Ang-2 pode conter ou não resíduos terminais suplementares, v.g., sequências líderes, sequências de encaminhamento, resíduos metionina no terminal amino, resíduos metionina e lisina no terminal amino e/ou sequências de proteínas de fusão ou de identificação, dependendo isso da maneira da sua preparação.

O termo "biologicamente activo", quando utilizado a propósito de Ang-2 ou de um agente de ligação específico, refere-se a um péptido ou polipéptido que possua pelo menos uma actividade característica de Ang-2 ou de um agente de ligação específico de Ang-2. Um agente de ligação específico de Ang-2 pode ter actividade agonista, antagonista, neutralizadora ou bloqueadora em relação a pelo menos uma actividade biológica de Ang-2.

O termo "agente de ligação específico" designa uma molécula, de preferência uma molécula proteínica, que se ligue especificamente a Ang-2, e seus derivados e variantes, conforme aqui definido. Um agente de ligação específico pode ser uma proteína, um péptido, um ácido nucleico, um hidrato de carbono, um lípido ou um composto de peso molecular pequeno que se ligue preferencialmente a

Ang-2. De acordo com uma variante preferencial, o agente de ligação específico de acordo com a presente invenção é um péptido ou um peptícorpo, e também seus fragmentos, derivados e variantes, quer por si só quer em combinação com outras sequências de aminoácidos, obtidas por técnicas conhecidas. Tais técnicas compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, a clivagem enzimática, a clivagem química, a síntese peptídica ou as técnicas recombinantes. Os agentes de ligação específicos anti-Ang-2 da presente invenção têm aptidão para apresentar parcelas de ligação a Ang-2 que modulam, *v.g.*, inibem ou favorecem a actividade biológica de Ang-2 e/ou outras actividades associadas a Ang-2.

O termo "variantes", tal como aqui utilizado, compreende os péptidos e polipéptidos em que há resíduos aminoácidos que são inseridos, suprimidos e/ou substituídos na sequência do aminoácido que ocorre naturalmente (ou que seja pelo menos conhecido) para o agente de ligação. As variantes da invenção compreendem as proteínas de fusão, conforme adiante descrito.

O termo "derivados" compreende os agentes de ligação que tenham sido quimicamente modificados, de alguma maneira distinta daquilo que sucede com as variantes por inserção, deleção ou substituição.

O termo "que se liga especificamente a Ang-2" designa a aptidão de um agente de ligação específico (tal como um peptícorpo ou uma sua parcela peptídica) da presente invenção para reconhecer e se ligar a um polipéptido Ang-2 humano maturo, de comprimento completo ou de comprimento parcial, ou um seu ortólogo, de tal modo que a sua afinidade (conforme determinada, *v.g.*, pelos ensaios de

afinidade ELISA ou BIAcore, conforme aqui descritos) ou a sua capacidade neutralizadora (conforme determinado, *v.g.*, pelos ensaios de neutralização ELISA, conforme aqui descrito, ou por meio de ensaios semelhantes) seja pelo menos 10 vezes superior, mas facultativamente 50 vezes superior, 100, 250 ou 500 vezes superior, ou até mesmo pelo menos 1000 vezes superior à afinidade ou à capacidade de neutralização do mesmo para qualquer outra angiopoietina ou qualquer outro péptido ou polipéptido, em que a parcela peptídica do peptidocorpo é fundida em primeiro lugar com um radical Fc humano para a avaliação em tal ensaio.

O termo "epítopo" designa a parcela de qualquer molécula capaz de ser reconhecida por um agente de ligação específico e de se ligar a ele, *v.g.*, um peptidocorpo, em uma ou várias regiões de ligação do antigénio do agente de ligação. Os epítopos são normalmente constituídos por agrupamentos de moléculas quimicamente tensioactivos, por exemplo, cadeias laterais de aminoácidos ou de hidratos de carbono, e possuem características estruturais tridimensionais específicas e também características de cargas eléctricas específicas. Os epítopos, tais como os aqui utilizados, podem ser contíguos ou não contíguos.

O termo "epítopo inibidor e/ou neutralizador" é um epítopo que ao estar ligado por um agente de ligação específico, tal como um peptidocorpo, origina a perda (ou pelo menos a diminuição) de actividade biológica da molécula, da célula ou do organismo que contenha tal epítopo, *in vivo*, *in vitro* ou *in situ*. No contexto da presente invenção, o epítopo neutralizador está localizado numa região biologicamente activa de Ang-2 ou está associado a ela. Em alternativa, o termo "epítopo

ativador" é um epítopo que ao estar ligado por um agente de ligação específico da invenção, tal como um anticorpo, origina a activação, ou pelo menos a manutenção de uma conformação biologicamente activa, de Ang-2.

O termo "fragmento de peptícorpo" refere-se a um péptido ou polipéptido que contenha menos de um peptícorpo completo e intacto.

O termo "que ocorre naturalmente" quando utilizado em associação com materiais biológicos, tais como moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos, células hospedeiras e semelhantes, refere-se a este tipo de entidades que se encontram na natureza e que não foram modificadas por nenhum ser humano.

O termo "isolado" quando utilizado em associação com a Ang-2 ou com um agente de ligação específico de Ang-2 refere-se a um composto que esteja isento pelo menos de um polipéptido ou composto contaminante existente no seu ambiente natural e que preferencialmente se encontre praticamente isento de quaisquer outros polipéptidos contaminantes provenientes de mamíferos, que pudessem interferir com a sua utilização terapêutica ou para fins de diagnóstico.

O termo "maturo", quando utilizado em associação com o peptícorpo de Ang-2 ou com um seu fragmento, ou com qualquer outro agente de ligação específico proteínico de Ang-2, refere-se a um péptido ou a um polipéptido a que falte uma sequência líder ou de sinal. Quando um agente de ligação da invenção é expresso, por exemplo, numa célula de hospedeira procariótica, o péptido ou polipéptido "maturo também pode conter resíduos aminoácidos suplementares (mas a que também falte uma sequência líder), tal como um

resíduo metionina ou um vários resíduos metionina e lisina no terminal amino. Um péptido ou um polipéptido produzido desta maneira pode ser utilizado quer os resíduos aminoácidos suplementares tenham sido ou não removidos.

Os termos "quantidade eficaz" e "quantidade terapeuticamente eficaz", quando utilizados a propósito de uma agente de ligação específico de Ang-2, designam uma quantidade de um agente de ligação específico que seja útil ou necessária para suportar uma modificação observável no nível de uma ou várias actividade biológicas de Ang-2. A modificação pode ser quer um aumento quer uma diminuição no nível de actividade de Ang-2. De preferência, a modificação é uma diminuição da actividade de Ang-2.

O termo "peptícorpo" designa uma molécula que compreende um domínio Fc de anticorpo acoplado pelo menos a um péptido. A produção de peptícorpos encontra-se descrita genericamente na publicação PCT com o nº WO 00/24782, datada de 4 de Maio de 2000.

O termo "variantes", tal como aqui utilizado, designa moléculas tais como péptidos ou combinações entre péptidos-veículos, por exemplo, os peptícorpos da presente invenção em que os resíduos aminoácidos são inseridos, suprimidos e/ou substituídos nas sequências de aminoácidos de tais moléculas. As variantes em que há um ou vários aminoácidos inseridos compreendem as proteínas de fusão adiante descritas.

O termo "derivados" compreende os péptidos e/ou combinações entre péptidos-veículos, tais como os peptícorpos que tenham sido quimicamente modificados por algum processo distinto do praticado nas variantes obtidas por inserção, deleção ou substituição.

O termo "fragmento" refere-se a um péptido ou a combinação entre péptido-veículo que compreenda menos do que a sequência de aminoácidos de comprimento completo de tais péptidos e/ou combinações entre péptidos-veículos. Um tal fragmento pode ser obtido, por exemplo, por meio de um truncamento no terminal amino, um truncamento no terminal carboxi e/ou por uma deleção interna de resíduos retirados da sequência de aminoácidos do péptido ou da combinação entre péptido-veículo. Os fragmentos podem ser obtidos pela metodologia alternativa de junção de ARN ou pela actividade de proteases *in vivo* ou *in vitro*. Tais fragmentos também podem ser construídos recorrendo aos métodos químicos da síntese de péptidos ou mediante a modificação de um polinucleótido que codifique um péptido, uma combinação entre péptido-veículo ou uma parcela Fc e/ou uma parcela peptídica de um peptidocorpo.

O termo "Fc" refere-se a um tipo de veículo da presente invenção e compreende a sequência de um fragmento de ligação não antigénico de um anticorpo resultante da digestão proteolítica de um anticorpo integral, quer na forma monomérica quer na forma multimérica. A fonte do Fc da presente invenção é, de preferência, totalmente Fc humano e pode ser uma qualquer das imunoglobulinas, embora sejam preferíveis as IgG1 e IgG2. No entanto, também são aqui incluídas as moléculas de Fc parcialmente humanas ou que sejam obtidas a partir de espécies não humanas. Os Fc são constituídos por polipéptidos monoméricos que podem ser unidos em formas diméricas ou multiméricas por associação covalente (isto é, pontes dissulfureto) e não covalente. O número de pontes dissulfureto intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc naturais varia

entre 1 e 4, dependendo isso da classe (v.g., IgG, IgA, IgE) ou da subclasse (v.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2). Um exemplo de um Fc natural é um dímero unido por pontes dissulfureto resultante da digestão de uma IgG com papaína [ver Ellison *et al.* (1982), Nucl. Acids. Res. 10: 4071-9]. O termo "Fc natural", tal como aqui utilizado, é genérico para as formas monoméricas, diméricas e multiméricas.

O termo "domínio Fc" engloba as moléculas e sequências de Fc natural e de variantes de Fc, conforme definido antes. Tal como sucede com as variantes de Fc e com os Fc naturais, o termo "domínio Fc" compreende moléculas nas formas monomérica ou multimérica, quer tenha havido digestão a partir do anticorpo integral quer tenha sido produzido por outros meios.

O termo "multímero", quando aplicado a domínios Fc ou a moléculas que compreendam domínios Fc, refere-se a moléculas que possuam pelo menos duas ou mais cadeias polipeptídicas associadas de forma covalente, não covalente ou por meio de interacções simultaneamente covalentes e não covalentes. Tipicamente, as moléculas de IgG formam dímeros; as moléculas de IgM formam pentámeros; as moléculas de IgD formam dímeros e as moléculas de IgA formam monómeros, dímeros, trímeros ou tetrameros. Os multímeros podem ser formados tirando proveito da sequência e da actividade resultante da fonte de Ig natural do Fc ou transformando artificialmente (conforme adiante definido) esse Fc natural.

O termo "dímero", quando aplicado a domínios Fc ou a moléculas que compreendam domínios Fc, refere-se a moléculas que possuam duas cadeias polipeptídicas associadas de forma covalente ou não covalente.

O termo "veículo" refere-se a uma molécula que evite a degradação e/ou aumente o período de semi-vida, reduza a toxicidade, reduza a imunogenicidade ou aumente a actividade biológica de uma proteína terapêutica. Como exemplos de veículos refere-se um domínio Fc e também um polímero linear (v.g., polietileno-glicol (PEG), polilisina, dextrano, etc.); um polímero de cadeia ramificada (ver, por exemplo, a patente de invenção norte-americana n° 4 289 872 de Denkenwalter datada de 15 de Setembro de 1981; a patente de invenção norte-americana n° 5 229 490 de Tam datada de 20 de Julho de 1993; o documento WO 93/21259 de Frechet *et al.*, publicado a 28 de Outubro de 1993); um lípido; um grupo colesterol (tal como um esteróide); um hidrato de carbono ou um oligossacarídeo; ou qualquer proteína, polipéptido ou péptido de origem natural ou sintética que se ligue a um receptor recuperador. Os veículos estão melhor descritos mais adiante.

Os termos "transformação" e "derivado" ou "transformado" designam respectivamente processos e os compostos resultantes em que (1) o composto possui uma parte cíclica; por exemplo, interligações entre resíduos cisteínico dentro do composto; (2) o composto é interligado ou possui um local de interligação; por exemplo, o composto possui um resíduo cisteínico e conseqüente forma dímeros interligados em cultura ou *in vivo*; (3) uma ou várias ligações peptídicas são substituídas por ligações não peptídicas; (4) o terminal N é substituído por -NRR1, NRC(O)R1, -NRC(O)OR1, -NRS(O)2R1, -NHC(O)NHR, um grupo succinimida ou benziloxi-carbonil-NH- substituído ou insubstituído, em que os radicais R e R1 e os substituintes no anel possuem as significações adiante definidas; (5) o

terminal C é substituído por $-C(O)R_2$ ou $-NR_3R_4$, em que os radicais R_2 , R_3 e R_4 possuem as significações adiante definidas; e (6) compostos em que cada um dos radicais aminoácidos é modificado mediante tratamento com agentes capazes de reagirem com cadeias laterais seleccionadas ou com resíduos terminais. Os derivados estão melhor descritos mais adiante.

O termo "péptido" refere-se a moléculas que possuam entre cerca de 3 e cerca de 75 aminoácidos, sendo preferíveis as moléculas que possuam entre cerca de 5 e 50 aminoácidos, mais preferíveis as que possuam entre 8 e 40 e ainda muito mais preferíveis as que contenham entre cerca de 10 e 25 aminoácidos. Os péptidos podem ter sequências de aminoácidos que ocorram naturalmente ou tenham origem natural (isto é, não ocorrem naturalmente). Os péptidos exemplificativos podem ser gerados por qualquer dos métodos aqui explicitados, por exemplo, provenientes de uma biblioteca de péptidos (v.g., uma bibliotca de "phage display", ou seja, de expressão em fagos), gerados por síntese química, obtidos por digestão de proteínas ou gerados recorrendo a técnicas de ADN recombinante.

O termo "farmacologicamente activo" significa que uma substância assim qualificada possui actividade que afecta um parâmetro médico (v.g., pressão sanguínea, número de hematócitos, nível do colesterol) ou um estado patológico (v.g., cancro, doenças autoimunes, etc.).

Os termos "péptido antagonista" ou "péptido inibidor" referem-se a um péptido que bloqueie ou que de alguma forma interfira com a actividade biológica da proteína associada relevante, ou que tenha uma actividade biológica comparável com a de um conhecido antagonista ou inibidor da proteína

relevante associada. Assim, o termo "péptido antagonista de Ang-2" designa os péptidos que possam ser identificados ou obtidos com características antagonistas de Ang-2.

Para além de tudo isto, os sais fisiologicamente aceitáveis dos compostos da presente invenção também estão aqui abrangidos. O termo "sais fisiologicamente aceitáveis" serve para designar todos os sais que sejam conhecidos ou venham a ser conhecidos e sejam farmacologicamente aceitáveis. Alguns exemplos específicos são: acetatos, trifluoroacetatos, halo-hidratos, tais como cloridratos e bromidratos, sulfatos, citratos, tartratos, glicolatos, oxalatos, mesilatos e fosfatos.

Peptícorpos

De acordo com um dos seus aspectos a presente invenção visa o desenvolvimento de peptícorpos de Ang-2. A interacção de um ligando proteínico com o seu receptor ocorre frequentemente numa interface relativamente grande. No entanto, conforme demonstrado para o caso da hormona do crescimento humano e seu receptor, são apenas muitos poucos os resíduos da interface que contribuem com a maior parte da energia de ligação. Clackson *et al.*, Science 267: 383-6 (1995). A massa principal do ligando proteínico apenas apresenta os epítomos de ligação na topologia correcta ou desempenha funções sem relação com a ligação. Assim, as moléculas que tenham apenas o comprimento de "péptido" (geralmente 2 a 20 aminoácidos) podem ligar-se à proteína receptora de um determinado ligando proteínico grande. Tais péptidos podem simular a bioactividade do ligando proteínico grande ("agonistas peptídicos") ou, através de

ligação competitiva, podem inibir a bioactividade do ligando proteínico grande ("antagonistas peptídicos").

Há agora uma tecnologia de "phage display" que constitui um método poderoso para a identificação de agonistas e de antagonistas. Ver, por exemplo, Scott *et al.*, Science 249: 386 (1990); Devlin *et al.*, Science 249: 404 (1990); patente de invenção norte-americana nº 5 223 409, emitida a 29 de Junho de 1993; patente de invenção norte-americana nº 5 733 731, emitida a 31 de Março de 1998; patente de invenção norte-americana nº 5 498, 530, emitida a 12 de Março de 1996; patente de invenção norte-americana nº 5 432, 018, emitida a 11 de Julho de 1995; patente de invenção norte-americana nº 5 338 665, emitida a 16 de Agosto de 1994; patente de invenção norte-americana nº 5 922 545, emitida a 13 de Julho de 1999; documento WO 96/40987, publicado a 19 de Dezembro de 1996 e documento WO 98/15833, publicado a 16 de Abril de 1998 (considera-se cada um destes documentos aqui incorporados por referência). Nas bibliotecas de "phage display" peptídicas, as sequências aleatórias de péptidos podem ser exibidas por fusão com proteínas de revestimento de fagos filamentosos. Os péptidos exibidos podem ser objecto de eluição por afinidade em presença de um domínio extracelular imobilizado por anticorpo, se desejado. O fago retido pode ser enriquecido por meio de ciclos consecutivos de purificação por afinidade e repropagação. É possível fazer a sequenciação dos péptidos que melhor se ligam para identificar resíduos fundamentais no seio de uma ou várias famílias de péptidos estruturalmente congéneres. Ver, *v.g.*, Cwirla *et al.*, Science 276: 1696-9 (1997), em que foram identificadas duas famílias distintas. As sequências

peptídicas também podem sugerir quais os resíduos que possam ser seguramente substituídos fazendo a exploração com alanina ou por mutagénese ao nível do ADN. É possível criar bibliotecas mutagénicas e explorá-los para otimizar ainda mais a sequência dos melhores *linkers*. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 401-24 (1997).

Também é possível utilizar a análise estrutural da interacção proteína-proteína para encontrar possíveis péptidos que simulem a actividade de ligação de ligandos proteínicos grandes. Numa análise deste tipo, a estrutura cristalina pode sugerir a identidade e a orientação relativa de resíduos críticos do ligando proteínico grande, a partir do qual possa ser arquitectado um péptido. Ver, v.g., Takasaki *et al.*, Nature Biotech 15: 1266-70 (1997). Estes métodos analíticos também podem ser utilizados para investigar a interacção entre uma proteína receptora e péptidos seleccionados pela técnica de "phage display", o que pode sugerir outra modificação dos péptidos para aumentar a afinidade de ligação.

Há outros métodos que competem com a técnica de "phage display" na pesquisa de péptidos. É possível fundir uma biblioteca de péptidos no terminal carboxilo do repressor *lac* e fazer a sua expressão *E. coli*. Um outro método baseado em *E. coli* permite a apresentação sobre a membrana exterior das células por fusão com uma lipoproteína associada ao peptidoglicano (PAL). Doravante, estes métodos, também conhecidos como técnicas de "display" e outros congéneres são colectivamente designados por "apresentação em *E. coli*". Ainda de acordo com um outro método, interrompe-se a tradução de ARN aleatório antes da libertação ribossómica, daí resultando uma biblioteca de

polipéptidos com o seu ARN associado ainda acoplado. Doravante, estes métodos e métodos congêneres serão colectivamente designados por "apresentação ribossómica". Há outros métodos em que se aplica a ligação química de péptidos ao ARN. Ver, por exemplo, Roberts e Szostak, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 12297-303 (1997). Doravante, este método e métodos congêneres serão colectivamente designados por "rastreio de ARN-péptidos". Foram já desenvolvidas bibliotecas de péptidos obtidas quimicamente em que os péptidos são imobilizados sobre materiais não biológicos estáveis, tais como varetas de polietileno ou resinas permeáveis a solventes. Uma outra biblioteca de péptidos obtidas quimicamente recorre à fotolitografia para rastrear péptidos imobilizados sobre lamelas de vidro. Doravante, estes métodos e métodos congêneres serão colectivamente designados por "rastreio de péptidos de origem química". O rastreio de péptidos de origem química pode ser vantajosa na medida em que permite a utilização de aminoácidos D e de outros análogos não naturais e também elementos não peptídicos. Ambos os métodos biológico e químico foram descritos por Wells e Lowman, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 3: 355-62 (1992).

Conceptualmente, poder-se-á descobrir a mimética peptídica de qualquer proteína utilizando a técnica "phage display" e outros métodos supramencionados. Estes métodos foram já utilizados para a mapeamento de epítomos, para a identificação de aminoácidos críticos em interacções de tipo proteína-proteína e como metodologias de primeiro plano para a pesquisa de novos agentes terapêuticos. Ver, *v.g.*, Cortese *et al.*, *Curr. Opin. Biotech.* 7: 616-21 (1996). As bibliotecas de péptidos estão agora a ser

utilizadas mais frequentemente em estudos imunológicos, por exemplo, na mapeamento de epítomos. Ver Kreeger, *The Scientist* 10(13): 19-20 (1996).

Os péptidos identificados por exploração de bibliotecas de "phage display" foram considerados como "elementos de primeiro plano" mais no sentido do desenvolvimento de agentes terapêuticos do que como sendo eles próprios agentes terapêuticos. Tal como sucede com outras proteínas e péptidos, é provável que possam ser rapidamente removidos *in vivo* quer por filtração renal quer por mecanismos de depuração celular no sistema reticuloendotelial, quer por degradação proteolítica [Francis, (*supra*)]. Em consequência, na técnica actual são utilizados péptidos para validar possíveis fármacos importantes ou plataformas para a concepção de compostos orgânicos que eventualmente possam não ser identificados tão fácil ou tão rapidamente através de exploração da biblioteca por via química [Lowman, (*supra*); Kay et al., (*supra*)]. A técnica poderia beneficiar com um processo que permitisse que tais péptidos pudessem gerar mais rapidamente agentes terapêuticos contra a angiogénese.

Estrutura dos peptícorpos

Nas composições de substâncias preparadas de acordo com a presente invenção, o péptido pode ser acoplado a um veículo através do terminal N ou do terminal C desse péptido. Assim, as moléculas de tipo veículo-péptido da presente invenção podem ser descritas pelas cinco fórmulas gerais subsequentes e seus multímeros:

$(X_1)_a-F_1-(X_2)_b$	(FÓRMULA GERAL I)
X_1-F_1	(FÓRMULA GERAL II)
F_1-X_2	(FÓRMULA GERAL III)
$F_1-(L_1)_c-P_1$	(FÓRMULA GERAL IV)
$F_1-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2$	(FÓRMULA GERAL V)

em que:

F_1 é um veículo (de preferência um domínio F_c);

cada um dos radicais X_1 e X_2 é seleccionado independentemente entre $-(L_1)_c-P_1$, $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2$, $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2-(L_3)_e-P_3$ e $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2-(L_3)_e-P_3-(L_4)_f-P_4$;

cada um dos radicais P_1 , P_2 , P_3 e P_4 representa independentemente sequências de péptidos farmacologicamente activos do tipo aqui descrito;

cada um dos radicais L_1 , L_2 , L_3 e L_4 representa independentemente um *linker* e

cada um dos símbolos "a", "b", "c", "d", "e" e "f" representa independentemente 0 ou 1, desde que pelo menos um dos símbolos "a" e "b" representa 1.

Péptidos

A presente invenção contempla péptidos que se ligam selectivamente ou que se ligam especificamente a Ang-2. É possível utilizar um número qualquer de tais péptidos no âmbito da presente invenção. A técnica de "phage display", em particular, é útil para gerar péptidos utilizáveis na presente invenção, conforme ficou comprovado pelo facto de a selecção por afinidade a partir de bibliotecas de péptidos aleatórios poder servir para identificar ligandos peptídicos para qualquer local de qualquer produto génico.

Dedman *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 23025-30 (1993). Os péptidos da presente invenção podem ser preparados por meio de todos os métodos conhecidos na especialidade. São utilizadas as abreviaturas de aminoácidos com uma letra só. O símbolo "X" em qualquer sequência (e ao longo da presente memória descritiva, salvo quando especificado de outro modo num caso particular) significa que pode estar presente qualquer dos 20 resíduos aminoácidos que ocorrem naturalmente ou qualquer dos aminoácidos que ocorrem de forma não natural (adiante descritos em "variantes"). Todos estes péptidos podem ser ligados em tandem (isto é, sequencialmente), com ou sem *linkers*, estando indicados no quadro exemplos de péptidos ligados em tandem. Os *linkers* estão identificados por "L" e podem ser todos os *linkers* aqui descritos. As repetições em tandem e os *linkers* estão representados separadamente por travessões, por razões de clareza. Qualquer péptido que contenha um resíduo cisteína pode ser interligado com outro péptido que contenha um resíduo Cys, podendo qualquer um deles ou ambos serem ligados a um veículo. Qualquer péptido que possua mais do que um resíduo Cys pode formar também uma ponte dissulfureto interpeptídica. Todos estes péptidos podem ser obtidos ou modificados conforme aqui descrito. No caso dos derivados em que o terminal carboxilo pode ser protegido com um grupo amino, então o grupo amino de protecção é -NH₂. No caso dos derivados em que os resíduos aminoácidos são substituídos por radicais que não são resíduos aminoácidos, então as substituições são identificadas por S, assim se designando todos os radicais descritos na obra de Bhatnagar *et al.*, J. Med. Chem. 39: 3814-9 (1996) e Cuthbertson *et al.*, J. Med. Chem. 40: 2876-82 (1997), que

se consideram incorporadas por referência. Todos os péptidos são ligados através de pontes peptídicas, salvo quando especificado de outro modo.

Veículos

De acordo com uma variante, a presente invenção prevê pelo menos um péptido acoplado pelo menos a um veículo (F_1 , F_2) através do terminal N, do terminal C ou de uma cadeia lateral de um dos resíduos aminoácidos desses péptidos. Também é possível utilizar veículos múltiplos, *v.g.*, um fragmento Fc em cada terminal ou um fragmento Fc num terminal e um grupo PEG no outro terminal ou uma cadeia lateral.

Um domínio Fc é um veículo preferencial. O domínio Fc pode ser fundido com qualquer dos terminais N ou C dos péptidos ou com ambos os terminais N e C.

Conforme se disse antes, as variantes de Fc são veículos adequados no âmbito da presente invenção. Um domínio Fc natural pode ser exaustivamente modificado para se obter uma variante de Fc de acordo com a presente invenção, desde que seja conservada a ligação ao receptor recuperador. Ver, por exemplo, os documentos WO 97/34631 e WO 96/32478. Em tais variantes de Fc, é possível remover um ou vários locais de um domínio Fc natural que proporcione particularidades estruturais ou actividades funcionais não solicitadas pelas moléculas de fusão da presente invenção. Estes locais podem ser removidos, por exemplo, substituindo ou suprimindo resíduos, inserindo resíduos no local ou truncando parcelas que contenham o local. Os resíduos inseridos ou substituídos também podem ser aminoácidos alterados, tais como peptidomiméticos ou aminoácidos D. as

variantes de Fc podem ser desejáveis por inúmeras razões, estando várias delas descritas adiante. Como exemplos de variantes de Fc refere-se as moléculas e as sequências em que:

1. os locais implicados na formação de pontes dissulfureto são removidos. Tal remoção pode impedir a reacção com outras proteínas que contenham cisteína, presentes nas células hospedeiras utilizadas para a produção das moléculas da presente invenção. Com esta finalidade, o segmento que contém cisteína no terminal N pode ser truncado ou então os resíduos podem ser suprimidos ou substituídos por outros aminoácidos (v.g., alanilo, serilo). Mesmo quando os resíduos cisteína são removidos, os domínios Fc de cadeia singular podem continuar a formar um domínio Fc dimérico que se mantém coeso de uma forma não covalente.

2. Modifica-se um domínio Fc natural para o tornar mais compatível com uma célula hospedeira seleccionada. Por exemplo, é possível remover a sequência PA junto ao terminal N de um Fc natural típico, o qual pode ser reconhecido por uma enzima digestiva em *E. coli*, tal como uma prolina-iminopeptidase. Também é possível acrescentar um resíduo metionilo ao terminal N, especialmente quando a molécula é expressa de forma recombinante numa célula bacteriana tal como as de *E. coli*.

3. Remove-se uma parcela do terminal N de um Fc natural para evitar a heterogeneidade do terminal N quando a expressão tem lugar numa célula hospedeira seleccionada. Para tal fim, é possível suprimir quaisquer dos primeiros 20 resíduos aminoácidos no terminal N, em particular os que estão nas posições 1, 2, 3, 4 e 5.

4. Faz-se a remoção de um ou vários locais de glicosilação. É possível conferir uma resposta citolítica aos resíduos que estejam tipicamente glicosilados (v.g., asparagina). Tais resíduos podem ser suprimidos ou substituídos por resíduos não glicosilados (v.g., alanina).

5. São removidos os locais implicados na interacção com o complemento, tais como o local de ligação de C1q. Por exemplo, é possível suprimir ou substituir a sequência EKK da IgG1 humana. A restauração do complemento pode não ser vantajosa para as moléculas da presente invenção e por isso pode ser evitada com tal variante de Fc.

6. São removidos os locais que afectem a ligação aos receptores Fc diferentes de um receptor recuperador. Um Fc natural pode possuir locais para interacção com determinados leucócitos que não são necessários para as moléculas de fusão da presente invenção, podendo por isso ser removidos.

7. Remove-se o local ADCC. Os locais ADCC são conhecidos na especialidade. Ver, por exemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992) a propósito dos locais ADCC em IgG1. Estes locais também não são necessários para as moléculas de fusão da presente invenção, podendo por isso ser removidos.

8. Quando o Fc natural é obtido a partir de um anticorpo não humano, então o Fc natural pode ser humanizado. Tipicamente, para se humanizar um Fc natural far-se-á a substituição de resíduos seleccionados no Fc natural não humano por resíduos que se encontrem normalmente no Fc natural humano. As técnicas para a humanização de anticorpos são perfeitamente conhecidas na especialidade.

Um veículo alternativo poderia ser uma proteína, um polipéptido, um péptido, um anticorpo, um fragmento de anticorpo ou uma molécula pequena (v.g., um composto peptidomimético) capaz de se ligar a um receptor recuperador. Por exemplo, poder-se-ia utilizar como veículo um polipéptido do tipo descrito na patente de invenção norte-americana nº 5 739 277, datada de 14 de Abril de 1998, de Presta *et al.* Os péptidos também poderiam ser seleccionados por "phage display" para ligação ao receptor recuperador FcRn. Tais compostos de ligação ao receptor recuperador também estão abrangidos na significação de "veículo" e estão abrangidos no âmbito da presente invenção. Tais veículos deveriam ser seleccionados para ter maior período de semi-vida (v.g., evitando as sequências reconhecidas por proteases) e menor imunogenicidade (v.g., favorecendo as sequências não imunogénicas, conforme conclusões da humanização de anticorpos).

Conforme se disse antes, também podem ser utilizados veículos poliméricos para F₁ e F₂. Estão presentemente disponíveis diversos métodos para acoplar radicais químicos úteis enquanto veículos, ver, v.g., tratado de cooperação de patentes de invenção ("PCT") internacional publicado com o nº WO 96/11953, com o título "N-Terminally Chemically Modified Protein Compositions and Methods", obra que aqui se considera totalmente integrada por referência. Esta publicação do PCT descreve, entre outras coisas, o acoplamento selectivo de polímeros solúveis em água ao terminal N proteínas.

Um veículo polimérico preferencial é o polietileno-glicol (PEG). O grupo PEG pode ter um peso molecular conveniente qualquer e pode ser linear ou ramificado. O

peso molecular médio do grupo PEG irá estar compreendido preferencialmente entre cerca de 2 quiloDalton ("kDa") e cerca de 100 kDa, mais preferencialmente entre cerca de 5 kDa e cerca de 50 kDa e muito mais preferencialmente entre cerca de 5 kDa e cerca de 10 kDa. Os grupos PEG irão ser geralmente acoplados aos compostos da invenção por acilação ou por alquilação redutora através de um grupo reactivo no radical PEG (v.g., um grupo aldeído, amino, tiol ou éster), a um grupo reactivo no composto da invenção (v.g., um grupo aldeído, amino ou éster).

Uma estratégia útil para a PEGilação de péptidos sintéticos consiste em combinar, mediante a formação de uma ligação conjugada em solução, um péptido e um radical PEG, sendo cada um deles portador de uma funcionalidade especial que seja mutuamente reactiva com a outra. Os péptidos podem ser preparados facilmente recorrendo a metodologias convencionais de fase sólida conhecidas na especialidade. Os péptidos são "pré-activados" com um grupo funcional adequado no local específico. Os precursores são purificados e totalmente caracterizados antes de reagirem com o radical PEG. A ligação do péptido ao PEG é feita normalmente em fase aquosa e pode ser facilmente monitorizada por HPLC analítica de fase inversa. Os péptidos PEGilados podem ser facilmente purificados por HPLC preparativa e podem ser caracterizados por HPLC analítica, pela análise dos aminoácidos e por espectrometria de massa por dessorção de laser.

Os polímeros polissacarídicos constituem um outro tipo de polímeros solúveis em água que podem ser utilizados para a modificação de proteínas. Os dextranos são polímeros polissacarídicos constituídos por subunidades individuais

de glicose predominantemente ligadas por 1-6 ligações. O próprio dextrano está disponível em diversos intervalos de pesos moleculares e obtém-se facilmente com pesos moleculares compreendidos entre cerca de 1 kDa e cerca de 70 kDa.

O dextrano é um polímero adequado solúvel em água utilizável na presente invenção como veículo por si próprio ou em combinação com um outro veículo (v.g., Fc). Ver, por exemplo, os documentos WO 96/11953 e WO 96/05309. A utilização de dextrano conjugado com imunoglobulina terapêuticas ou de diagnóstico foi já descrita; ver, por exemplo, a publicação da patente europeia nº 0 315 456, que se considera aqui incorporada por referência. É preferível dextrano com um peso molecular compreendido entre cerca de 1 kDa e cerca de 20 kDa, se esse dextrano for utilizado como veículo de acordo com a presente invenção.

Linkers

Todos os grupos "linkers" são facultativos. Quando presentes a sua estrutura química não é crítica, uma vez que a sua função fundamental é a de separadores. Um *linker* é feito preferencialmente de aminoácidos ligados entre si por pontes peptídicas. Assim, em variantes preferenciais, o *linker* contém entre 1 e 20 aminoácidos ligados por pontes peptídicas, sendo os aminoácidos seleccionados entre os 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente. Um ou vários destes aminoácidos podem ser glicosilados, conforme é perfeitamente sabido pelos especialistas na matéria. Numa variante mais preferencial, os referidos 1 a 20 aminoácidos são seleccionados entre glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina e lisina. Ainda mais

preferencialmente, um *linker* é constituído por uma maioria de aminoácidos espacialmente desimpedidos, tais como a glicina e a alanina. Deste modo, os *linkers* preferenciais são as poliglicinas (em particular (Gly)₅, (Gly)₈), poli-(Gly-Ala) e as polialaninas. Também são preferíveis combinações de Gly e Ala enquanto *linker* aqui designado por K1 e com a sequência de aminoácidos explicitada nos exemplos subsequentes.

Também é possível utilizar *linkers* não peptídicos. Por exemplo, é possível utilizar *linkers* alquílicos, tais como -NH-(CH₂)_s-C(O)-, em que $s = 2-20$. Estes *linkers* alquílicos ainda podem ser substituídos por qualquer grupo não espacialmente obstruidor, por exemplo, um grupo alquilo inferior (v.g., C₁-C₆), um grupo acilo inferior, um átomo de halogéneo (v.g., Cl, Br), um grupo CN, um grupo NH₂, um grupo fenilo, etc.. Como exemplo de um *linker* não peptídico refere-se um *linker* PEG, com peso molecular compreendido entre 100 e 5000 kDa e de preferência entre 100 e 500 kDa. Os *linkers* peptídicos podem ser alterados para formarem derivados, da mesma maneira anteriormente descrita.

Variantes e derivados

As variantes e os derivados dos agentes de ligação específicos estão abrangidos no âmbito da presente invenção. No conjunto das variantes refere-se as variantes obtidas por inserção, deleção e substituição. Subentende-se que um agente de ligação específico particular da presente invenção pode conter um, dois ou três tipos de variantes. As variantes obtidas por inserção e substituição podem conter aminoácidos naturais, aminoácidos não convencionais (conforme adiante especificado) ou de ambos os tipos.

Num exemplo são utilizadas variantes por inserção em que um ou vários resíduos aminoácidos, quer sejam aminoácidos que ocorram naturalmente quer sejam aminoácidos não convencionais, complementam uma sequência de aminoácidos de um péptido ou de um peptidocorpo. As inserções podem estar localizadas em qualquer um dos terminais da proteína ou em ambos ou podem estar situadas dentro das regiões internas da sequência de aminoácidos do peptidocorpo. As variantes obtidas por inserção com resíduos suplementares em qualquer dos terminais ou em ambos compreendem, por exemplo, as proteínas de fusão e as proteínas que contenham etiquetas ou marcadores de aminoácidos. As variantes obtidas por inserção compreendem os péptidos e os peptidocorpos em que um ou vários resíduos aminoácidos são acrescentados à sequência de aminoácidos do péptido ou do peptidocorpo ou seus fragmentos.

Os produtos de variantes da invenção compreendem também os péptidos e peptidocorpos maduros em que foram removidas as sequências líder ou de sinal, e as proteínas resultantes que possuam resíduos suplementares no terminal amino, podendo esses aminoácidos ser naturais ou não naturais. Estão contemplados agentes de ligação específicos (tais como os peptidocorpos) com um resíduo metionilo suplementar na posição -1 dos aminoácidos (Met^{-1} peptidocorpo), e também os agentes de ligação específicos com resíduos suplementares de metionina e lisina nas posições -2 e -1 ($\text{Met}^{-2}\text{-Lys}^{-1}$). As variantes que possuam resíduos suplementares Met, Met-Lys, Lys (ou um ou vários resíduos básicos, em geral) são particularmente úteis para uma maior produção de proteínas recombinantes em células hospedeiras bacterianas.

A invenção compreende também variantes de agentes de ligação específicos que possuam resíduos aminoácidos suplementares obtidos mediante a utilização de sistemas de expressão específicos. Por exemplo, a utilização de vectores comercialmente disponíveis que realizem a expressão de um polipéptido desejado como parte de um produto de fusão com glutathione-S-transferase (GST) proporciona o polipéptido desejado com um resíduo glicina suplementar na posição -1 dos aminoácidos, após clivagem do componente GST a partir do polipéptido desejado. Também estão contempladas as variantes que resultem da expressão de outros sistemas de vectores, incluindo aqueles em que as caudas de poli-histidina são incorporadas na sequência de aminoácidos, geralmente no terminal carboxi e/ou no terminal amino da sequência.

As variantes por inserção compreendem também proteínas de fusão em que os terminais amino e/ou carboxi do péptido ou do peptidocorpo se encontram fundidos com um outro polipéptido, com um seu fragmento ou com aminoácidos que não sejam geralmente reconhecidos como parte de qualquer sequência específica de proteína. Como exemplos de tais proteínas de fusão refere-se os polipéptidos imunogénicos, proteínas com longos períodos de semi-vida de circulação, tais como as regiões constantes das imunoglobulinas, as proteínas marcadoras, as proteínas ou os polipéptidos que facilitem a purificação do péptido ou do peptidocorpo desejado, e as sequências polipeptídicas que favoreçam a formação de proteínas multiméricas (tais como os motivos *leucine-zipper* que são úteis na formação/estabilização de dímeros).

Este tipo de variante obtida por inserção possui geralmente a totalidade ou uma parte substancial da molécula nativa ligada no terminal N ou no terminal C à totalidade ou a uma parte de um segundo polipéptido. Por exemplo, nas proteínas de fusão utiliza-se tipicamente sequências líder provenientes de outras espécies para permitir a expressão recombinante de uma proteína num hospedeiro heterólogo. Uma outra proteína de fusão útil contém a adição de um domínio imunologicamente activo, tal como um epítopo de anticorpo, para facilitar a purificação da proteína de fusão. A inclusão de um local de clivagem na junção de fusão ou próximo dela irá facilitar a remoção do polipéptido exógeno após a purificação.

Há outros produtos de fusão úteis que compreendem a ligação de domínios funcionais, tais como locais activos provenientes de enzimas, domínios de glicosilação, sinais de encaminhamento celular ou regiões transmembranares.

Nos circuitos comerciais há diversos sistemas de expressão de proteínas de fusão disponíveis que podem ser utilizados na presente invenção. Os sistemas particularmente úteis compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, o sistema de glutathione-S-transferase (GST) (Pharmacia), o sistema proteínico de ligação de maltose (NEB, Beverley, MA), o sistema FLAG (IBI, New Haven, CT) e o sistema 6 x His (Qiagen, Chatsworth, CA). Estes sistemas conseguem produzir péptidos recombinantes e/ou peptícorpos portadores apenas de um número pequeno de aminoácidos suplementares para os quais se considera improvável que afectem significativamente a actividade do péptido ou do peptícorpo. Por exemplo, tanto o sistema FLAG como o sistema 6 x His acrescentam apenas

sequências curtas, sabendo-se que ambos são fracamente antigénicos e que não afectam adversamente o enrolamento de um polipéptido que resulta na sua conformação natural. Uma outra fusão do terminal N considerada útil é a fusão de um dipéptido Met-Lys na região do terminal N das proteínas ou dos péptidos. Uma fusão deste tipo pode produzir acréscimos benéficos na expressão ou na actividade da proteína.

Há outros sistemas de fusão que produzem híbridos polipeptídicos quando for desejável excisar o parceiro de fusão a partir do péptido ou peptidocorpo desejado. De acordo com uma variante, o parceiro de fusão é ligado ao peptidocorpo recombinante por uma sequência peptídica que contém uma sequência de reconhecimento específica para uma protease. Como exemplos de sequências adequadas refere-se as reconhecidas pela protease do vírus "etch" do tabaco (TEV) (Life Technologies, Gaithersburg, MD) ou o factor Xa (New England Biolabs, Beverley, MA).

A invenção proporciona também polipéptidos de fusão que compreendem a totalidade ou uma parte de um peptidocorpo ou de um péptido da presente invenção, em combinação com o factor tecidual truncado (tTF). O factor tTF é um agente de encaminhamento vascular constituído por uma forma truncada de uma proteína indutora da coagulação humana que actua como agente coagulante dos vasos sanguíneos tumorais, conforme descrito nas patentes de invenção norte-americanas n^{os}: 5 877 289; 6 004 555; 6 132 729; 6 132 730; 6 156 321; e na patente de invenção europeia n^o EP 0988056. A fusão do factor tTF com o peptidocorpo ou péptido anti-Ang-2, ou com os seus fragmentos facilita a administração de anti-Ang-2 às células destinatárias.

De acordo com outro aspecto, a invenção proporciona variantes de deleção em que um ou vários resíduos aminoácidos num péptido ou num peptícorpo são removidos. As deleções podem ser efectuadas em um ou em ambos os terminais do peptícorpo, ou podem ser removidos um ou vários resíduos ao longo da sequência de aminoácidos do peptícorpo. As variantes por deleção compreendem necessariamente todos os fragmentos de um péptido ou de um peptícorpo.

Ainda de acordo com um outro aspecto, a invenção proporciona variantes de substituição de péptidos e peptícorpos da invenção. As variantes de substituição compreendem os péptidos e peptícorpos em que um ou vários resíduos aminoácidos são removidos e substituídos por um ou vários aminoácidos alternativos, podendo esses aminoácidos ser dos tipos que ocorrem naturalmente ou não naturalmente. As variantes por substituição geram péptidos e peptícorpos que são "semelhantes" ao péptido ou peptícorpo original, na medida em que as duas moléculas possuem uma determinada percentagem de aminoácidos idênticos. As variantes por substituição compreendem as substituições de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 e 30 aminoácidos no interior de um péptido ou peptícorpo, em que o número de substituições pode ir até 10% ou mais dos aminoácidos do péptido ou peptícorpo. De acordo com um aspecto, as substituições são de natureza conservadora; no entanto, a invenção também diz respeito a substituições que sejam de tipo não conservador e compreende ainda aminoácidos não convencionais.

A identidade e a similaridade de péptidos e peptícorpos congêneres pode ser determinada facilmente por métodos conhecidos. Tais métodos compreendem, mas sem que

isso constitua qualquer limitação, os descritos em Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M. e Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); e Carillo *et al.*, SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988).

Os métodos preferenciais para a determinação do "parentesco" ou identidade percentual entre dois péptidos ou polipéptidos, ou entre um polipéptido e um péptido, são concebidos de modo a permitirem a correspondência máxima entre as sequências testadas. Os métodos para a determinação da identidade estão descritos e contidos em programas informáticos disponibilizados por instituições para o público em geral. Os métodos informáticos preferenciais para a determinação da identidade entre duas sequências compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, o pacote informático GCG, compreendendo os programas GAP (Devereux *et al.*, Nucl. Acid. Res., 12: 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990)). O programa BLASTX pode ser obtido em 'National Center for Biotechnology Information' (NCBI) e noutras fontes (BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, *supra* (1990)). Para a determinação da identidade

também é possível utilizar o algoritmo de Smith Waterman perfeitamente conhecido.

Alguns esquemas de alinhamento para alinhar duas sequências de aminoácidos podem ter como resultado o facto de apenas haver correspondência numa região curta das duas sequências, podendo esta região pequena alinhada apresentar uma identidade de sequência muito elevada, mesmo não havendo nenhuma relação significativa entre as duas sequências de comprimento completo. Assim sendo, em determinadas variantes, o método de alinhamento escolhido (programa GAP) irá ter como consequência um alinhamento que abrange pelo menos 10% do comprimento completo do polipéptido em causa que está a ser comparado, isto é, pelo menos 40 aminoácidos contíguos nos casos em que estejam a ser comparadas sequências que possuam pelo menos 400 aminoácidos, 30 aminoácidos contíguos nos casos em que estejam a ser comparadas sequências que possuam pelo menos entre 300 e cerca de 400 aminoácidos, pelo menos 20 aminoácidos contíguos nos casos em que estejam a ser comparadas sequências contendo entre 200 e cerca de 300 aminoácidos e pelo menos 10 aminoácidos contíguos nos casos em que estejam a ser comparadas sequências contendo entre cerca de 100 e 200 aminoácidos.

Por exemplo, utilizando o algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), faz-se o alinhamento de dois polipéptidos para os quais se pretende determinar o valor percentual de identidade de sequência de modo a que haja um emparelhamento óptimo dos seus respectivos aminoácidos (o "*matched span*" (comprimento de emparelhamento), conforme determinado pelo algoritmo). Em determinadas variantes, em

conjunto com o algoritmo, utiliza-se uma "gap open penalty" (função de custo de abertura de espaçamento) (calculado tipicamente como sendo 3 x o valor da diagonal média); a "diagonal média" é a média da diagonal da matriz de comparação que está a ser utilizada; a "diagonal" é o "score" (pontuação) ou o número atribuído a cada emparelhamento perfeito entre aminoácidos permitida pela matriz de comparação particular) e uma "gap extension penalty" (função de custo de extensão de espaçamento) (que é normalmente 1/10 da "gap opening penalty", ou seja, da função de custo de abertura de espaçamento) e também uma matriz de comparação tal como PAM 250 ou BLOSUM 62. Em algumas variantes, o algoritmo prevê também a utilização de uma matriz de comparação padrão (ver Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5 (3) (1978), para a matriz de comparação PAM 250; Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 10915-10919 (1992), para a matriz de comparação BLOSUM 62).

Em algumas formas de realização, os parâmetros para uma comparação entre sequências polipeptídicas são os seguintes:

algoritmo: Needleman *et al.*, J. Mol. Biol., 48: 443-453 (1970);

matriz de comparação: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, *supra* (1992);

"gap penalty" (custo de espaçamento): 12

"gap lenght penalty" (custo do comprimento do espaçamento): 4

"threshold of similarity" (limiar de similaridade): 0.

O programa GAP pode ser útil com os parâmetros anteriores. Em determinadas variantes, os parâmetros

supramencionados são os parâmetros por defeito para as comparações polipetídicas (sem introdução de nenhuma "penalty for end gaps", ou seja, função de custo para os espaçamentos terminais) utilizando o algoritmo GAP. Em determinadas formas de realização, os parâmetros para as comparações entre sequências de moléculas polinucleotídicas (em contraposição a uma sequência de aminoácidos) compreendem os seguintes:

algoritmo: Needleman *et al.*, *supra* (1970);
 matriz de comparação: emparelhamentos = +10,
 desemparelhamento = 0
 "gap penalty" (custo de espaçamento): 50
 "gap lenght penalty" (custo do comprimento do
 espaçamento): 3.

O programa GAP também pode ser útil com os parâmetros anteriores. Os parâmetros supramencionados são os parâmetros por defeito para comparações entre moléculas polinucleotídicas.

É possível utilizar outros algoritmos exemplificativos, "gap opening penalties" (função de custo de abertura de espaçamento), "gap extension penalties" (função de custo de extensão de espaçamento), "gap lenght penalties" (custo do comprimento do espaçamento), matrizes de comparação, limiares de similaridade, etc., incluindo os que estão explicitados na obra Program Manual, Wisconsin Package, Versão 9 de Setembro, 1997. As opções particulares realizáveis são evidentes para os especialistas na matéria e irão depender da comparação concreta que se pretenda fazer, tal como ADN-para-ADN, proteína-para-proteína, proteína-para-ADN; e complementarmente os casos em que a comparação é feita entre determinados pares de sequências

(casos em que se dá preferência geralmente aos programas GAP ou BestFit) ou entre uma sequência e um grande base de dados de sequências (caso em que são preferíveis os programas FASTA ou BLASTA).

Tal como aqui utilizado, os vinte aminoácidos convencionais e as suas abreviaturas estão em conformidade com a prática habitual. Ver Immunology - A Synthesis (2^a Edição, E. S. Golub e D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), obra que aqui se considera incorporada por referência para qualquer fim.

Os aminoácidos podem ter estereoquímica L ou D (excepto no caso de Gly, que não é nem L nem D) e os polipéptidos e composições da presente invenção podem compreender uma combinação de estereoquímicas. No entanto, é preferível a estereoquímica L. A invenção proporciona também moléculas inversas em que há uma inversão entre o terminal amino e o terminal carboxi na sequência de aminoácidos. Por exemplo, o inverso de uma molécula que possua a sequência normal $X_1-X_2-X_3$ será $X_3-X_2-X_1$. A invenção proporciona também moléculas retro-inversas em que, tal como se disse antes, há uma inversão entre o terminal amino e o terminal carboxi na sequência de aminoácidos e os resíduos que sejam normalmente enantiómeros "L" são alterados para a forma estereoisomérica "D".

Os estereoisómeros (v.g., aminoácidos D) dos vinte aminoácidos convencionais, os aminoácidos não naturais, tais como os aminoácidos α,α -dissubstituídos, os aminoácidos N-alquilados, o ácido láctico e outros aminoácidos não convencionais também podem ser componentes adequados para os polipéptidos da presente invenção. Como exemplos de aminoácidos não convencionais refere-se, sem

nenhuma limitação: ácido aminoadípico, β -alanina, ácido β -aminopropiônico, ácido aminobutírico, ácido piperidínico, ácido aminocapróico, ácido amino-heptanóico, ácido aminoisobutírico, ácido aminopimélico, ácido diaminobutírico, desmosina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiônico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, oritina, 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metil-histidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina e outros aminoácidos semelhantes (v.g., 4-hidroxiprolina).

De igual modo, salvo quando especificado de forma diferente, a extremidade do lado esquerdo das sequências polinucleotídicas de cadeia singular é a extremidade 5'; o sentido orientado para o lado esquerdo das sequências nucleotídicas de cadeia dupla é designado por sentido de 5'. O sentido de 5' para 3' com adição dos transcritos de ARN nascentes é designado por sentido de transcrição; as regiões da sequência na cadeia de ADN que possuem a mesma sequência que o ARN tem e que são 5' em relação à extremidade 5' do transcrito de ARN são designadas por "sequências a montante"; as regiões da sequência na cadeia de ADN que possuem a mesma sequência que o ARN tem e que são 3' em relação à extremidade 3' do transcrito de ARN são designadas por "sequências a jusante".

Faz-se observar que os resíduos aminoácidos podem ser classificados em classes com base nas suas propriedades comuns da cadeia lateral.

1. Hidrofóbicos neutros: Alanina (Ala; A), Valina (Val; V), Leucina (Leu; L), Isoleucina (Ile; I), Prolina (Pro; P), Triptofano (Trp; W), Fenilalanina (Phe; F) e Metionina (Met, M).

2. Polares neutros: Glicina (Gly; G); Serina (Ser; S), Treonina (Thr; T), Tirosina (Tyr; Y), Cisteína (Cys; C), Glutamine (Glu; Q), Asparagina (Asn; N) e Norleucina.

3. Acídicos: Ácido aspártico (Asp; D), Ácido glutâmico (Glu; E).

4. Básicos: Lisina (Lys; K), Arginina (Arg; R), Histidina (His; H). Ver Lewin, B., Genes V, Oxford University Press (1994), pág. 11.

As substituições de aminoácidos conservadoras podem abranger resíduos aminoácidos não convencionais, os quais são tipicamente incorporados por síntese química de péptidos em vez de o serem por síntese em sistemas biológicos. Estão aqui incluídas, sem nenhuma limitação, as formas peptidomiméticas e outras formas inversas ou invertidas de radicais aminoácidos. As substituições não conservadoras podem implicar a permuta de um membro de uma destas classes por um membro de uma outra classe.

Ao executar tais modificações, de acordo com determinadas variantes, pode ser considerado o índice hidropático dos aminoácidos. A cada aminoácido está associado um índice hidropático com base nas suas características de hidrofobicidade e carga eléctrica. Tais índices são: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5);

glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9) e arginina (-4,5).

A importância do índice hidropático dos aminoácidos para conferir uma função biológica interactiva a uma proteína é conhecida na especialidade. Kyte *et al.*, J. Mol. Biol., 157: 105-131 (1982). Sabe-se que determinados aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos que possuam a mesma classificação ou índice hidropático e continuarem a manter uma actividade biológica semelhante. Ao serem efectuadas modificações com base no índice hidropático, em determinadas variantes, está incluída a substituição de aminoácidos cujos índices hidropáticos estejam compreendidos no intervalo ± 2 . Em determinadas variantes, estão incluídas aquelas em que o índice está entre ± 1 em algumas variantes aquelas em que o índice está incluído entre $\pm 0,5$.

Sabe-se na especialidade que a substituição de aminoácidos semelhantes pode ser efectuada eficientemente com base na hidrofiliicidade, em particular se o peptidocorpo ou péptido biologicamente funcional assim criado se destinar a ser utilizado em variantes imunológicas, como é o caso presente. Em determinadas situações, o valor máximo da hidrofiliicidade média local de uma proteína, conforme determinado pela hidrofiliicidade dos seus aminoácidos adjacentes, está correlacionado com as suas imunogenicidade e antigenicidade, isto é, com uma propriedade biológica da proteína.

Foram atribuídos os seguintes valores de hidrofiliicidade aos seguintes resíduos aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2);

glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5) ; cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) e triptofano (-3,4). Ao serem efectuadas modificações com base em valores semelhantes de hidrofiliicidade, em determinadas variantes, está incluída a substituição de aminoácidos cujos valores de hidrofiliicidade esteja no intervalo ± 2 , em determinadas variantes estão incluídas aquelas cujos valores estejam no intervalo ± 1 e em determinadas variantes aquelas cujos valores estejam no intervalo $\pm 0,5$. Também é possível identificar epítomos a partir de sequências primárias de aminoácidos com base na hidrofiliicidade. Estas regiões são designadas também por “regiões nucleares epitópicas”.

Como exemplos de substituições de aminoácidos refere-se as explicitadas no quadro 2 subsequente.

Quadro 2

<u>Substituições de aminoácidos</u>		
Resíduos originais	Substituições exemplificativas	Substituições preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, Glu, Asp	Gln
Asp	Glu, Gln, Asp	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn, Glu, Asp	Asn
Glu	Asp, Gln, Asn	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg

Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	Arg

(continuação)

<u>Substituições de aminoácidos</u>		
Resíduos originais	Substituições exemplificativas	Substituições preferíveis
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Um especialista na matéria consegue determinar variantes adequadas do polipéptido aqui explicitado, recorrendo a técnicas perfeitamente conhecidas. Em determinados casos, um especialista na matéria pode identificar áreas adequadas da molécula que possam ser modificadas sem destruição da actividade, visando regiões não consideradas importantes para a actividade. Em determinados casos, é possível identificar parcelas de moléculas e resíduos que são conservados entre péptidos ou

polipéptidos semelhantes. Em determinados casos, até mesmo as áreas que eventualmente possam ser importantes para a actividade biológica ou para a estrutura podem ser submetidas a substituições de aminoácidos conservadoras, sem que haja destruição da actividade biológica ou sem que seja afectada prejudicialmente a estrutura do polipéptido.

Além disso, um especialista na matéria pode realizar estudos de tipo estrutura-função, identificando resíduos em polipéptidos semelhantes que sejam importantes para a actividade ou para a estrutura. À luz de uma tal comparação, é possível prever a importância dos resíduos aminoácidos numa proteína, que correspondam aos aminoácidos que sejam importantes para a actividade ou para a estrutura em proteínas semelhantes. Um especialista na matéria pode optar por substituições de aminoácidos quimicamente semelhantes para tais resíduos aminoácidos importantes previstos.

Um especialista na matéria também pode analisar a estrutura tridimensional e a sequência de aminoácidos tomando como referência esta estrutura em polipéptidos semelhantes. À luz de tal informação, um especialista na matéria consegue prever o alinhamento de resíduos aminoácidos de um anticorpo em relação à sua estrutura tridimensional. Em determinados casos, um especialista na matéria pode optar por não fazer modificações radicais nos resíduos aminoácidos que preveja que estejam sobre a superfície da proteína, uma vez que tais resíduos podem estar envolvidos em interacções importantes com outras moléculas. Mais ainda, um especialista na matéria pode gerar variantes de ensaio que contenham uma única substituição de aminoácido em cada resíduo aminoácido

desejado. As variantes podem ser depois analisadas recorrendo a ensaios de actividade conhecidos pelos especialistas na matéria. Tais variantes poderiam ser utilizadas para reunir informação sobre variantes adequadas. Por exemplo, se alguém concluir que uma modificação num resíduo aminoácido particular tem como resultado uma actividade destruída, indesejavelmente reduzida ou inconveniente, as variantes com tal modificação podem ser evitadas. Dito por outras palavras, com base na informação reunida a partir de tais experiências de rotina, um especialista na matéria consegue determinar facilmente quais os aminoácidos onde devem ser evitadas mais substituições quer por si só quer em combinação com outras mutações.

Há inúmeras publicações científicas dedicadas à previsão de estruturas secundárias. Ver Moult J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7 (4): 422-427 (1996), Chou et al., *Biochemastry*, 13 (2): 222-245 (1974); Chou et al., *Biochemistry*, 113 (2): 211-222 (1974); Chou et al., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978); Chou et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276 e Chou et al., *Biophys. J.*, 26: 367-384 (1979). Além disso, há presentemente programas informáticos que ajudam a prever a estrutura secundária. Um método de previsão da estrutura secundária tem por base a modulação de homologia. Por exemplo, dois polipéptidos ou duas proteínas que tenham uma identidade sequencial superior a 30%, ou uma similaridade superior a 40%, possuem frequentemente topologias estruturais semelhantes. O desenvolvimento recente de bases de dados estruturais de proteínas (PDB) veio aumentar a previsibilidade das estruturas secundárias, incluindo o

número potencial de vezes contidas numa estrutura de um polipéptido ou de uma proteína. Ver Holm *et al.*, Nucl. Acid. Res., 27 (1): 244-247 (1999). Foi já sugerido (Brenner *et al.*, Curr. Op. Struct. Biol., 7 (3): 369-376 (1997)) que o número de vezes num dado polipéptido ou numa proteína é limitado e uma vez resolvido um número crítico de estruturas, a previsão estrutural torna-se extraordinariamente mais exacta.

Outros métodos de previsão da estrutura secundária compreendem "concatenação" (Jones, D., Curr. Open. Struct. Biol., 7 (3): 377-87 (1997); Sippl *et al.*, Structure, 4 (1): 15-19 (1996)), a "análise de perfil" (Bowie *et al.*, Science, 253: 164-170 (1991); Gribskov *et al.*, Meth. Enzym., 183: 146-159 (1990); Gribskov *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 84 (13): 4355-4358 (1987)) e a "ligação evolutiva" (ver Holm, *supra* (1999) e Brenner, *supra* (1997)).

Em determinados casos, as variantes de peptícorpos compreendem variantes de glicosilação em que foram acrescentados aos peptícorpo um ou vários locais de glicosilação, tais como um local de glicosilação com ligações N. Um local de glicosilação com ligações N caracteriza-se pelas sequências Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, em que o resíduo aminoácido designado por X pode ser qualquer resíduo aminoácido com a excepção da prolina. A substituição ou a adição de resíduos aminoácidos para criar esta sequência proporciona um novo local potencial para a adição de uma cadeia de hidratos de carbono com ligações N. Em alternativa, as substituições que eliminem esta sequência irão remover uma cadeia existente de hidratos de carbono com ligações N. Também está previsto um rearranjo

de cadeias de hidratos de carbono com ligações N em que um ou vários locais de glicosilação com ligações N (tipicamente, aqueles que ocorram de maneira natural) são eliminados e um ou vários locais novos com ligações N são criados.

A invenção proporciona também "derivados" que compreendem peptícorpos portadores de modificações diferentes ou complementares de inserções, supressões ou substituições de resíduos aminoácidos. De preferência, as modificações são de natureza covalente e compreendem, por exemplo, o acoplamento químico com polímeros, lípidos e com outros radicais orgânicos e inorgânicos. É possível preparar derivados da invenção para aumentar o período de semi-vida de circulação de um peptícorpo ou é possível concebê-los de modo a melhorar a capacidade de encaminhamento do peptícorpo para as células, tecidos ou órgãos desejados.

Como exemplos de derivados refere-se os radicais em que foram efectuadas um ou várias das modificações seguintes:

- uma ou várias das ligações (uniões) peptidílicas $[-C(O)NR-]$ foram substituídas por uma ligação não peptidílica, tal com uma ligação $-CH_2$ -carbamato $[-CH_2-OC(O)NR-]$; uma ligação fosfonato; uma ligação $-CH_2$ -sulfonamida $[-CH_2-S(O)_2NR-]$; uma ligação ureia $[-NHC(O)NH-]$; uma ligação $-CH_2$ -amina secundária ou uma ligação peptidílica alquilada $[-C(O)NR^6-]$, em que o símbolo R^6 representa um grupo alquilo inferior];

- péptidos em que o terminal N é transformado num grupo $-NRR^1$; num grupo $-NRC(O)R$; num grupo $-NRC(O)OR$; num grupo $-NRS(O)_2R$; num grupo $-NHC(O)NHR$, em que os símbolos R

e R^1 representam o átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo inferior, com a condição de os símbolos R e R^1 não representarem simultaneamente o átomo de hidrogénio; num grupo succinimida; num grupo benziloxycarbonil-NH- (CBZ-NH-) ou num grupo benziloxycarbonil-NH- que possua entre 1 a 3 substituintes no anel fenilo, seleccionado entre o conjunto constituído por alquilo inferior, alcoxi inferior, cloro e bromo e

- péptidos em que o terminal C livre é transformado em $-C(O)R^2$, em que o radical R^2 é seleccionado entre o conjunto constituído por alcoxi inferior e $-NR^3R^4$, em que os radicais R^3 e R^4 são seleccionados independentemente entre o conjunto constituído por átomos de hidrogénio e alquilo inferior. O termo "inferior" significa que um grupo possui entre 1 e 6 átomos de carbono.

Além disso, é possível introduzir modificações de aminoácidos individuais nos polipéptidos ou composições da invenção, fazendo reagir os resíduos aminoácidos relevantes do péptido com um agente orgânico de transformação que seja capaz de reagir com as cadeias laterais seleccionadas ou com resíduos terminais. O que a seguir se indica é exemplificativo.

É possível fazer reagir resíduos terminais lisinilo e amino com anidridos do ácido succínico ou de outros ácidos carboxílicos. A transformação com estes agentes tem o efeito de inverter a modificação dos resíduos lisinilo. Outros reagentes adequados para a transformação de resíduos que contenham α -amino compreendem os imidoésteres, tais como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal, piridoxal; cloroboro-hidreto; ácido trinitrobenzeno-

sulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona e a reacção com glioxilato catalisada com transaminase.

É possível modificar os resíduos arginilo por reacção com um ou vários reagentes convencionais, referindo-se entre eles fenil-glioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona e ninidrina. A transformação de resíduos arginina exige que a reacção seja executada em condições alcalinas devido ao elevado valor do índice pKa do grupo funcional guanidina. Além disso, estes reagentes podem reagir com os grupos de lisina e também com o grupo guanidino da arginina.

A modificação específica do resíduo tirosilo *per si* foi já estudada exaustivamente, com particular interesse no que diz respeito à introdução de identificadores espectrais nos resíduos tirosilo por reacção com compostos de diazónio aromáticos ou tetranitrometano. Mais vulgarmente, é possível utilizar N-acetil-imidazole e tetranitrometano para formar espécies respectivamente de O-acetil-tirosilo e derivados em 3-nitro.

É possível modificar selectivamente os grupos laterais carboxilo (aspartilo ou glutamilo) por reacção com carbodiimidas ($R'-N=C=N-R'$), tais como 1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)-carbodiimida ou 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)-carbodiimida. Mais ainda, os resíduos aspartilo e glutamilo podem ser convertidos em resíduos asparaginilo e glutaminilo por reacção com iões amónio.

Os resíduos glutaminilo e asparaginilo são frequentemente desamidados para darem os correspondentes resíduos glutamilo e aspartilo. Em alternativa, estes resíduos podem ser desaminados em condições moderadamente

acídicas. Todas as formas destes resíduos estão abrangidas no âmbito da presente invenção.

A transformação com agentes bifuncionais é útil para fazer a interligação dos péptidos ou dos seus derivados funcionais a uma matriz de suporte insolúvel em água ou a outros veículos macromoleculares. Como agentes de interligação vulgarmente utilizados refere-se, v.g., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxi-succinimida, por exemplo, ésteres com o ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de dissuccinimidilo, tais como 3,3'-ditiobis-(succinimidilpropionato), e maleimidas bifuncionais, tais como bis-N-maleimido-1,8-octano. Os agentes de transformação tais como metil-3-[(p-azidofenil)-ditio]-propioimidato produzem intermediários fotoactiváveis que são capazes de formar ligações cruzadas na presença de luz. Em alternativa, para a imobilização de proteínas é possível utilizar matrizes reactivas, insolúveis em água, tais como os hidratos de carbono activados por brometo de cianogénio e os substratos reactivos descritos nas patentes de invenção norte-americanas nºs 3 969 287; 3 691 016; 4 195 128; 4 247 642; 4 229 537 e 4 330 440.

Outras modificações possíveis compreendem a hidroxilação da prolina e da lisina, a fosforilação de grupos hidroxilo de resíduos serilo e treonina, a oxidação do átomo de enxofre em Cys, a metilação de grupos α -amino de cadeias laterais de lisina, arginina e histidina (Creighton, T. E., *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)), a acetilação do amina do terminal N e, em alguns casos, a amidação dos grupos carboxilo do terminal C.

Tais radicais transformados melhoram preferencialmente uma ou várias características, incluindo a actividade anti-aniogénica, solubilidade, absorção, período de semi-vida biológica e outras propriedades idênticas dos compostos. Em alternativa, os radicais transformados podem dar origem a compostos que tenham as mesmas características ou praticamente as mesmas características e/ou propriedades do composto que não foi transformado. Em alternativa, os radicais podem eliminar ou atenuar qualquer efeito secundário indesejado dos compostos, e não só.

Os compostos da presente invenção também podem ser modificados do ADN. A sequência de ADN de qualquer parcela do composto pode ser modificada de modo a possuir codões mais compatíveis com a célula hospedeira escolhida. No caso de *E. coli*, que é a célula hospedeira preferencial, os codões otimizados são conhecidos na especialidade. É possível substituir codões para eliminar locais de restrição ou para incorporar locais de restrição sem efeito aparente, podendo isso ajudar a fazer o processamento do ADN na célula hospedeira escolhida. As sequências do veículo, do *linker* e do ADN do péptido podem ser modificadas de modo a conterem quaisquer das modificações de sequências referidas antes. Deste modo, todas as modificações, substituições, transformações, etc., aqui enunciadas são igualmente aplicáveis a todos os aspectos da presente invenção, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, aos péptidos, aos dímeros e multímeros peptídicos aos *linkers* e aos veículos.

Além do mais, um especialista na matéria pode realizar estudos do tipo estrutura-função para identificar resíduos em péptidos semelhantes que sejam importantes para a

actividade ou para a estrutura. À luz de uma tal comparação, é possível prever a importância de resíduos aminoácidos num péptido, que corresponda a resíduos aminoácidos que sejam importantes para a actividade ou a estrutura em péptidos semelhantes. Um especialista na matéria pode optar por substituições de aminoácidos quimicamente semelhantes para tais resíduos previstos aminoácidos importantes dos péptidos.

Um especialista na matéria também pode analisar a estrutura tridimensional e a sequência de aminoácidos tomando como por base essa estrutura em polipéptidos semelhantes. À luz de tal informação, um especialista na matéria consegue prever o alinhamento dos resíduos aminoácidos de um péptido em relação à sua estrutura tridimensional. Em determinados casos, um especialista na matéria pode decidir não fazer modificações radicais nos resíduos aminoácidos previstos sobre a superfície da proteína, uma vez que tais resíduos podem estar implicados em interacções importantes com outras moléculas. Mais ainda, um especialista na matéria pode gerar variantes de ensaio que contenham uma única substituição de aminoácidos em cada resíduo aminoácido desejado. As variantes podem ser então pesquisadas utilizando ensaios de actividade conhecidos pelos especialistas na matéria. Tais dados poderiam ser utilizadas para reunir informação sobre variantes adequadas. Por exemplo, no caso de se concluir que uma modificação num resíduo aminoácido particular tivesse como resultado uma actividade destruída, indesejavelmente reduzida ou inadequada, as variantes com tal modificação poderiam ser evitadas. Dito por outras palavras, com base na informação reunida a partir de tais

experiências de rotina, um especialista na matéria consegue determinar facilmente quais os aminoácidos em que devam ser evitadas outras substituições, quer por si sós quer em combinação com outras mutações.

Há inúmeras publicações científicas dedicadas à previsão de estruturas secundárias. Ver Moult J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7 (4): 422-427 (1996), Chou et al., *Biochemastry*, 13 (2): 222-245 (1974); Chou et al., *Biochemistry*, 113 (2): 211-222 (1974); Chou et al., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978); Chou et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276 e Chou et al., *Biophys. J.*, 26: 367-384 (1979). Além disso, há presentemente programas informáticos que ajudam a prever a estrutura secundária. Um método de previsão da estrutura secundária tem por base a modulação de homologia. Por exemplo, dois polipéptidos ou proteínas que tenham uma identidade sequencial superior a 30%, ou uma similaridade superior a 40%, possuem frequentemente topologias estruturais semelhantes. O desenvolvimento recente de bases de dados estruturais de proteínas (PDB) veio aumentar a previsibilidade das estruturas secundárias, incluindo o número potencial de vezes contidas numa estrutura de um polipéptido ou de uma proteína. Ver Holm et al., *Nucl. Acid. Res.*, 27 (1): 244-247 (1999). Foi já sugerido (Brenner et al., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7 (3): 369-376 (1997)) que o número de vezes num dado polipéptido ou numa proteína é limitado e uma vez resolvido um número crítico de estruturas, a previsão estrutural torna-se extraordinariamente mais exacta.

Outros métodos de previsão da estrutura secundária compreendem a "concatenação" (Jones, D., *Curr. Opin.*

Struct. Biol., 7 (3): 377-87 (1997); Sippl et al., Structure, 4 (1): 15-19 (1996)), a "análise de perfil" (Bowie et al., Science, 253: 164-170 (1991); Gribskov et al., Meth. Enzym., 183: 146-159 (1990); Gribskov et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 84 (13): 4355-4358 (1987)) e a "ligação evolutiva" (ver Holm, *supra* (1999) e Brenner, *supra* (1997)).

A invenção prevê também agentes de ligação específicos transformados, v.g., peptícorpos modificados de maneira covalente para conterem uma ou várias uniões poliméricas solúveis em água, tais como polietileno-glicol, polioxietileno-glicol ou polipropileno-glicol, conforme descrito nas patentes de invenção norte-americanas n^{os}: 4 640 835; 4 496 689; 4 301 144; 4 670 417; 4 791 192 e 4 179 337. Há ainda outros polímeros úteis, conhecidos na especialidade, seleccionados entre monometoxi-polietileno-glicol, dextrano, celulose ou outros polímeros à base de hidratos de carbono, poli-(N-vinil-pirrolidona)-polietileno-glicol, homopolímeros de propileno-glicol, um co-polímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polióis polioxietilados (v.g., glicerol) e álcool polivinílico, bem como misturas de tais polímeros. São particularmente preferíveis os peptícorpos modificados de maneira covalente com subunidades de polietileno-glicol (PEG). Os polímeros solúveis em água podem ser ligados em posições específicas, por exemplo, no terminal amino dos peptícorpos, ou podem ser acoplados aleatoriamente a uma ou várias cadeias laterais do polipéptido. A utilização de PEG para melhorar a capacidade terapêutica de agentes de ligação específicos, v.g., peptícorpos, e para anticorpos humanizados em particular, encontra-se descrita na patente de invenção

norte-americana nº 6 133 426 de Gonzales *et al.*, datada de 17 de Outubro de 2000.

A invenção contempla também a transformação do péptido e/ou de uma parte do veículos dos compostos. Tais derivados podem melhorar a solubilidade, a absorção, o período de semi-vida biológica e propriedades semelhantes dos compostos. Em alternativa, os radicais podem eliminar ou atenuar quaisquer efeitos secundários indesejáveis dos compostos e não só. Como exemplos de derivados refere-se os compostos em que:

1. O composto, ou alguma sua parcela, é cíclico. Por exemplo, a parcela peptídica pode ser modificada de modo a conter dois ou mais resíduos Cys (*v.g.*, no *linker*) o que poderia originar ciclização por formação de uma ponte dissulfureto.

2. O composto é reticulado ou passa a ser capaz de formar ligações cruzadas entre moléculas. Por exemplo, a parcela peptídica pode ser modificada de modo a conter um resíduo Cys, ficando assim capaz de formar uma ponte dissulfureto intermolecular com uma molécula idêntica. O composto também pode ser interligado através do seu terminal C.

3. Uma ou várias das ligações (uniões) peptidílicas [-C(O)NR-] são substituídas por uma ligação não peptidílica. Como exemplos de ligações não peptidílicas refere-se uma ligação -CH₂-carbamato [-CH₂-OC(O)NR-]; uma ligação fosfonato; uma ligação -CH₂-sulfonamida [-CH₂-S(O)₂NR-]; uma ligação ureia [-NHC(O)NH-]; uma ligação -CH₂-amina secundária ou uma ligação peptidílica alquilada [-C(O)NR⁶-], em que o símbolo R⁶ representa um grupo alquilo inferior].

4. O terminal é transformado. De uma forma típica, o terminal N pode ser acilado ou modificado para conter uma amina substituída. Como exemplos de grupos de transformação do terminal N refere-se os seleccionados entre $-NRR^1$ (diferente de $-NH_2$), $-NRC(O)R_1$, $-NRC(O)OR_1$, $-NRS(O)_2R_1$, $-NHC(O)NHR_1$, succinimida ou benziloxicarbonilo-NH- (CBZ-NH-), em que cada um dos símbolos R e R_1 representa independentemente o átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo inferior e em que o anel fenilo pode ser substituído com 1 a 3 substituintes seleccionados entre o conjunto constituído por alquilo(C_1-C_4), alcoxi(C_1-C_4), cloro e bromo.

5. O terminal C livre é transformado. De uma forma típica, o terminal C é esterificado ou amidado. Por exemplo, é possível utilizar métodos descritos na especialidade para acrescentar $(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$ aos compostos da presente invenção no terminal C. De igual modo, é possível utilizar métodos descritos na especialidade para acrescentar $-NH_2$ aos compostos da presente invenção no terminal C. Como exemplos de grupos de transformação do terminal C refere-se, por exemplo, os grupos $-C(O)R_2$, em que o símbolo R_2 representa um grupo alcoxi inferior, ou $-NR_3R_4$, em que os símbolos R_3 e R_4 representam independentemente o átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo(C_1-C_8) (de preferência alquilo(C_1-C_4)).

6. Uma ponte dissulfureto é substituída por um outro radical de interligação, de preferência mais estável (v.g., um grupo alquilenos). Ver, v.g., Bhatnagar (*supra*) ; Alberts *et al.*, Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9 (1993).

7. Faz-se a modificação de um ou vários resíduos aminoácidos individuais. São conhecidos diversos agentes de transformação sobre os quais se sabe que reagem

especificamente com cadeias laterais seleccionadas ou com resíduos terminais, conforme adiante descrito minuciosamente.

É possível fazer reagir resíduos lisinilo e resíduos do terminal amino com anidridos succínicos ou outros anidridos de ácidos carboxílicos, o que inverte a modificação nos resíduos lisinilo. Como exemplos de outros reagentes convenientes para transformar resíduos que contenham α -amino refere-se os imidoésteres, tais como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroboro-hidreto; ácido trinitrobenzeno-sulfónico; O-metilisoureia; 2,4-pentanodiona e a reacção com glioxilato catalisada com transaminase.

É possível modificar os resíduos arginilo por reacção com um ou vários reagentes convencionais, referindo-se entre eles fenil-glioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona e ninidrina. A transformação de resíduos arginilo exige que a reacção seja executada em condições alcalinas devido ao elevado valor do índice pKa do grupo funcional guanidina. Além disso, estes reagentes podem reagir com os grupos de lisina e também com o grupo ϵ -amino da arginina.

A modificação específica de resíduos tirosilo foi já estudada exaustivamente, com particular interesse no que diz respeito à introdução de identificadores espectrais nos resíduos tirosilo por reacção com compostos de diazónio aromáticos ou tetranitrometano. Mais vulgarmente, é possível utilizar N-acetil-imidazole e tetranitrometano para formar espécies respectivamente de O-acetil-tirosilo e derivados em 3-nitro.

É possível modificar selectivamente os grupos laterais carboxilo (aspartilo ou glutamilo) por reacção com carbodiimidas ($R'-N=C=N-R'$), tais como 1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)-carbodiimida ou 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)-carbodiimida. Mais ainda, os resíduos aspartilo e glutamilo podem ser convertidos em resíduos asparaginilo e glutaminilo por reacção com iões amónio.

Os resíduos glutaminilo e asparaginilo podem ser desamidados para darem os correspondentes resíduos glutamilo e aspartilo. Em alternativa, estes resíduos podem ser desaminados em condições moderadamente acídicas. Todas as formas destes resíduos estão abrangidas no âmbito da presente invenção.

Os resíduos cisteinilo podem ser substituídos por resíduos aminoácidos ou por outros radicais quer para eliminar a formação de pontes de dissulfureto ou então, inversamente, para estabilizar as interligações. Ver, *v.g.*, Bhatnagar, (*supra*).

A transformação com agentes bifuncionais é útil para fazer a interligação dos péptidos ou dos seus derivados funcionais a uma matriz de suporte insolúvel em água ou a outros veículos macromoleculares. Como agentes de interligação vulgarmente utilizados refere-se, *v.g.*, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxysuccinimida, por exemplo, ésteres com o ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de dissuccinimidilo, tais como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), e maleimidas bifuncionais, tais como bis-N-maleimido-1,8-octano. Os agentes de transformação tais como metil-3-[(p-azidofenil)-ditio]-propioimidato produzem intermediários fotoactiváveis que

são capazes de formar ligações cruzadas na presença de luz. Em alternativa, para a imobilização de proteínas é possível utilizar matrizes reactivas, insolúveis em água, tais como os hidratos de carbono activados por brometo de cianogénio e os substratos reactivos descritos nas patentes de invenção norte-americanas n^{os} 3 969 287; 3 691 016; 4 195 128; 4 247 642; 4 229 537 e 4 330 440.

É possível acoplar convenientemente grupos hidratos de carbono (oligossacarídeos) a locais sobre os quais se sabe que são locais de glicosilação em proteínas. De um modo geral, os oligossacarídeos ligados em O são acoplados a resíduos serina (Ser) ou treonina (Thr), ao passo que os oligossacarídeos ligados em N são acoplados a resíduos asparagina (Asn) se fizerem parte da sequência Asn-X-Ser/Thr, em que o símbolo X pode representar qualquer aminoácido com a excepção de prolina. De preferência, o símbolo X representa um dos 19 aminoácidos que ocorrem naturalmente, diferentes de prolina. As estruturas dos oligossacarídeos ligados em N e ligados em O e os resíduos açúcar encontrados em cada tipo são diferentes. Um tipo de açúcar que se encontra vulgarmente em ambos é o ácido N-acetileno-uramínico (designado por ácido siálico). O ácido siálico é vulgarmente o resíduo terminal de ambos os oligossacarídeos ligados em N e ligados em O e podem conferir, devido à sua carga eléctrica negativa, propriedades acídicas ao composto glicosilado. Tais locais podem ser incorporados no *linker* dos compostos da presente invenção e são preferencialmente glicosilados por uma célula durante a produção recombinante dos compostos polipeptídicos (v.g., em células de mamíferos, tais como as células CHO, BHK, COS). No entanto, tais locais podem ser

ainda glicosilados por meio de processos sintéticos ou semi-sintéticos conhecidos na especialidade.

Outras modificações possíveis compreendem a hidroxilação da prolina e da lisina, a fosforilação de grupos hidroxilo de resíduos serilo e treonina, a oxidação do átomo de enxofre em Cys, a metilação de grupos α -amino de cadeias laterais de lisina, arginina e histidina [Creighton, *Proteins: Structure and Molecule Properties*, (W. H. Freeman & Co., San Francisco), págs. 79-86 (1983)].

Os compostos da presente invenção também podem ser modificados do ADN. A sequência de ADN de qualquer parcela do composto pode ser modificada de modo a possuir codões mais compatíveis com a célula hospedeira escolhida. No caso de *E. coli*, que é a célula hospedeira preferencial, os codões otimizados são conhecidos na especialidade. É possível substituir codões para eliminar locais de restrição ou para incorporar locais de restrição sem efeito aparente, podendo isso ajudar a fazer o processamento do ADN na célula hospedeira escolhida. As sequências do veículo, do *linker* e do ADN do péptido podem ser modificadas de modo a conterem quaisquer das modificações de sequências referidas antes.

Maturação por afinidade

Uma variante da presente invenção compreende péptidos e peptícorpos com "maturação por afinidade". Este processo consiste em aumentar a afinidade ou a bioactividade dos péptidos e dos peptícorpos da presente invenção recorrendo à tecnologia de "phage display" (expressão em fagos) ou a outras tecnologias de selecção. Com base numa sequência de consenso (que é gerada para um conjunto de péptidos

congêneres) é possível gerar bibliotecas secundárias de "phage display" em que se mantém constante ou se influencia a frequência de ocorrência dos aminoácidos "core" (determinados a partir da sequência de consenso). Em alternativa, é possível utilizar uma sequência peptídica individual para gerar uma biblioteca de "phage display", enviesada (a favor da sequência) e dirigida. A aplicação da técnica de "panning" nessas bibliotecas permite obter péptidos (que podem ser convertidos em peptícorpos) com melhor ligação a Ang-2 ou com melhor bioactividade.

Análogos não peptídicos/miméticos de proteínas

Além do mais, também estão contemplados análogos de péptidos, não peptídicos, que proporcionam uma estrutura estabilizada ou conseguem uma biodegradação atenuada. Os análogos miméticos de péptidos podem ser preparados com base num péptido inibidor seleccionado, mediante a substituição de um ou vários resíduos por radicais não peptídicos. De preferência, os radicais não peptídicos permitem que o péptido conserve a sua conformação natural, ou estabilizam uma conformação preferencial, *v.g.*, bioactiva, que conserve a aptidão para reconhecer e se ligar a Ang-2. De acordo com um aspecto, o análogo/mimético resultante exhibe uma maior ligação por afinidade para Ang-2. Um exemplo de métodos para a preparação de análogos miméticos não peptídicos a partir de péptidos, é o descrito por Nachman *et al.*, Regul. Pept. 57: 359-370 (1995). Se desejado, os péptidos da invenção podem ser modificados, por exemplo, por glicosilação, amidação, carboxilação ou fosforilação ou mediante a criação de sais de adição de ácidos, amidas, ésteres, em particular ésteres do terminal

C, e derivados N-acilados dos péptidos da invenção. Os peptícorpos também podem ser modificados para criar derivados peptídicos por formação de complexos covalentes ou não covalentes com outros radicais. Os complexos ligados de maneira covalente podem ser preparados unindo os radicais químicos a grupos funcionais nas cadeias laterais de aminoácidos que compreendam os peptícorpos, ou aos terminais N ou C.

Em particular, desde já se afirma que os péptidos podem ser conjugados com um grupo repórter, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, um radiomarcador, um marcador fluorescente, uma enzima (v.g., que catalise uma reacção colorimétrica ou fluorométrica), um substrato, uma matriz sólida ou um veículo (v.g., biotina ou avidina). Deste modo, a invenção proporciona uma molécula, compreendendo uma molécula peptícorpo, em que a molécula possui ainda preferencialmente um grupo repórter seleccionado entre o conjunto constituído por um radiomarcador, um marcador fluorescente, uma enzima, um substrato, uma matriz sólida ou um veículo. Tais marcadores são perfeitamente conhecidos pelos especialistas na matéria, v.g., os marcadores de biotina são particularmente preferidos. A utilização de tais marcadores é perfeitamente conhecida pelos especialistas na matéria e está descrita, v.g., nas patentes de invenção norte-americanas n^{os} 3 817 837; 3 850 752; 3 996 345 e 4 277 437. Há outros marcadores que também poderão ser úteis, entre os quais se refere, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os marcadores radioactivos, os marcadores fluorescentes e os marcadores quimioluminescentes. As patentes de invenção norte-americanas respeitantes à utilização de tais marcadores

compreendem, por exemplo, as patentes de invenção norte-americanas n^{os} 3 817 837; 3 850 752; 3 939 350 e 3 996 345. Qualquer dos peptícorpos da presente invenção pode compreender um, dois ou mais de quaisquer destes marcadores.

Métodos para a preparação de péptidos

Os péptidos da presente invenção podem ser gerados recorrendo a uma grande variedade de técnicas conhecidas na especialidade. Por exemplo, tais péptidos podem ser sintetizados em solução ou sobre um suporte sólido, em conformidade com técnicas convencionais. Existem nos circuitos comerciais diversos sintetizadores automáticos que podem ser utilizados de acordo com protocolos conhecidos. Ver, por exemplo, Stewart e Young (*supra*); Tam *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 105: 6442, (1983); Merrifield, Science 232: 341-347 (1986); Barany e Merrifield, The Peptides, Gross e Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany *et al.*, Int. J. Pep. Protein Res., 30: 705-739 (1987); e a patente de invenção norte-americana n^o 5 424 398, cada um destes documentos aqui incorporados por referência.

Os métodos de síntese de péptidos em fase sólida recorrem a um co-poli(estireno-divinilbenzeno) contendo entre 0,1-1,0 mM de amina/g de polímero. Estes métodos para a síntese de péptidos recorrem à protecção dos grupos α -amino com butiloxicarbonilo (t-BOC) ou com 9-fluorenilmetiloxi-carbonilo (Fmoc). Ambos os métodos implicam passos de síntese progressiva, em que se adiciona-se um único aminoácido em cada passo, começando a partir do terminal C do péptido (ver Coligan *et al.*, Curr. Prot.

Immunol., Wiley Interscience, 1991, Unidade 9). Quando a síntese química se encontra completa é possível efectuar a desprotecção do péptido sintético removendo os grupos de bloqueio de aminoácidos t-BOC ou FMOC e fazendo a sua clivagem a partir do polímero por tratamento com um ácido a uma temperatura reduzida (v.g., anisole a 10% em HF líquido durante um período compreendido entre cerca de 0,25 e cerca de 1 hora a 0°C). Após a evaporação dos reagentes, os péptidos são extraídos do polímero com uma solução de ácido acético a 1%, fazendo-se depois a sua liofilização para proporcionar o material impuro. Este material pode ser purificado normalmente por técnicas tais como a filtração em gel sobre Sephadex G-15 utilizando como solvente ácido acético a 5%. A liofilização das fracções adequadas da coluna irá produzir péptidos homogéneos ou derivados peptídicos, os quais podem ser depois caracterizados por técnicas convencionais, tais como a análise de aminoácidos, a cromatografia de camada fina, a cromatografia em líquido de elevado rendimento, espectroscopia de absorção de ultravioletas, a rotação molar, a solubilidade e quantificação pelo método de degradação de Edman em fase sólida.

Estão também disponíveis outros métodos tais como a selecção de péptidos a partir de bibliotecas de "phage display". As bibliotecas podem ser preparadas a partir de conjuntos de aminoácidos, conforme aqui descrito. A técnica de "phage display" pode ser particularmente eficaz para a identificação de péptidos úteis de acordo com a invenção. Dito de forma abreviada, faz-se a preparação de uma biblioteca de fagos (utilizando, v.g., o fago ml 13, fd ou lambda), exibindo inserções contendo entre 4 e cerca de 80

resíduos aminoácidos. As inserções podem representar, por exemplo, uma matriz totalmente degenerada ou desequilibrada. É possível seleccionar então fagos portadores de inserções que se liguem ao antigénio desejado. Este processo pode ser repetido ao longo de diversos ciclos consecutivos de selecção de fagos que se liguem ao antigénio desejado. Os ciclos repetidos levam ao enriquecimento em fagos portadores de sequências particulares. É possível efectuar análises das sequências de ADN para identificar as sequências dos péptidos expressos. É possível determinar a parcela linear mínima da sequência que se liga ao antigénio desejado. O processo pode ser repetido utilizando uma biblioteca polarizada contendo inserções que contenham uma parte ou a totalidade da parcela linear mínima mais um ou vários resíduos degenerados suplementares que lhe fiquem a montante ou a jusante. Estas técnicas permitem identificar péptidos da invenção com uma afinidade de ligação para Ang-2 ainda maior do que os agentes já aqui identificados.

Independentemente da maneira como os péptidos são preparados, é possível gerar uma molécula de ácido nucleico que codifique cada um desses péptidos e peptícorpos utilizando processos convencionais de ADN recombinante. As sequências nucleotídicas de tais moléculas de ADN podem ser manipuladas conforme adequado, sem modificação da sequência de aminoácidos que codifica, para compensar a degeneração do código de ácidos nucleicos e também para compensar a preferência de códons em células hospedeiras particulares.

As técnicas de ADN recombinante são um método conveniente para a formação de peptícorpos de comprimento completo ou de outros de ligação específicos proteínicos

grandes da presente invenção, ou seus fragmentos. É possível inserir num vector de expressão uma molécula de ADN que codifique o peptícorpo ou o fragmento, podendo então esse vector ser inserido numa célula hospedeira para a produção do anticorpo ou do fragmento.

De um modo geral, a molécula de ADN que codifica um péptido ou um peptícorpo pode ser obtida utilizando processos aqui descritos nos exemplos. As sondas e as condições típicas de hibridação são idênticas às explicitadas em Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press [1994]). Após a hibridação, a autorradiografia hibridada pode ser lavada em condições rigorosas adequadas, dependendo isso de factores tais como a dimensão da sonda hibridante, a homologia esperada entre sonda e clone, o tipo de biblioteca que está a ser rastreado e o número de clones que estão a ser rastreados. Como exemplos de condições de pesquisa com rigor elevado refere-se a utilização de 0,1 x SSC e SDS a 0,1% a uma temperatura compreendida entre 50°C e 65°C.

É ainda possível utilizar dois métodos de pesquisa híbridos para identificar péptidos da invenção que se ligam a Ang-2. Assim, é possível utilizar o antigénio ou um seu fragmento para estudar bibliotecas de péptidos, incluindo bibliotecas de "phage display", para identificar e seleccionar agentes que se ligam a Ang-2, v.g., peptícorpos da presente invenção.

Em alternativa, é possível utilizar diversos sistemas constituídos por vector de expressão/hospedeiro de modo a conterem e expressarem os péptidos da invenção. Estes sistemas compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, microrganismos, tais como bactérias

transformadas com bacteriófagos recombinantes, vectores de expressão de ADN plasmídeo ou cosmídeo; leveduras transformadas com vectores de expressão de leveduras; sistemas de células de insectos infectadas com vectores de expressão de vírus (v.g., baculovírus); sistemas de células vegetais transfectadas com vectores de expressão de vírus (v.g., o vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; o vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformados com vectores de expressão bacteriana (v.g., o plasmídeo pBR322 ou Ti); ou sistemas de células de animais. As células de mamíferos consideradas úteis na produção de proteínas recombinantes compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as células VERO, as células HeLa, as linhagens de células do ovário de criceto chinês (CHO), as células COS (tais como COS-7) e as células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 e 293. Adiante estão descritos protocolos exemplificativos para a expressão recombinante dos péptidos.

O termo "vector de expressão" refere-se a um plasmídeo, fago, vírus ou vector, para a expressão de um polipéptido a partir de uma sequência de ADN (ARN). Um vector de expressão pode compreender uma unidade transcricional que contenha um conjunto constituído por (1) um ou vários elementos genéticos que desempenhem uma função reguladora na expressão do gene, por exemplo, promotores ou intensificadores, (2) uma unidade estrutural ou sequência que codifique o agente de ligação que é transcrito em ARNm e traduzido na proteína e (3) sequências adequadas para iniciar e terminar a transcrição. As unidades estruturais previstas para utilização em sistemas de expressão de leveduras ou eucarióticos compreendem preferencialmente uma

sequência líder que facilita a secreção extracelular da proteína traduzida por uma célula hospedeira. Em alternativa, quando a proteína recombinante é expressa sem uma sequência líder ou transportadora, então pode conter um resíduo metionilo no terminal amino. Este resíduo pode ou não ser depois clivado a partir da proteína recombinante expressa para proporcionar o produto peptídico final.

Por exemplo, os péptidos podem ser expressos por via recombinante em leveduras utilizando um sistema de expressão existente nos circuitos comerciais, *v.g.*, o sistema de expressão 'Pichia' (Invitrogen, San Diego, CA), executando as instruções do fabricante. Este sistema assenta também na sequência pré-pró- α para comandar a secreção, mas a transcrição da inserção é comandada pelo promotor de álcool-oxidase (AOX1) após indução pelo metanol.

O péptido segregado é purificado a partir do meio de desenvolvimento das leveduras, *v.g.*, recorrendo aos métodos utilizados para purificar o péptido a partir dos sobrenadantes bacterianos e das células de mamíferos.

Em alternativa, o ADNc que codifica o péptido pode ser clonado no vector pVL1393 de expressão de baculovírus (PharMingen, San Diego, CA). Este vector pode ser utilizado em conformidade com as instruções do fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* em meios isentos de proteínas sf9 e para produzir proteínas recombinantes. A proteína recombinante pode ser purificada e concentrada a partir dos meios recorrendo a uma coluna carregada com eparina-sefaroze (Pharmacia).

Em alternativa, o péptido pode ser expresso num sistema de insectos. Os sistemas de insectos para a expressão de proteínas são perfeitamente conhecidos pelos

especialistas na matéria, num sistema deste tipo é possível utilizar como vector o vírus da poliedrose nuclear *Autographa californica* (AcNPV) para a expressão de genes exógenos em células de *Spodoptera frugiperda* ou em larvas de *Trichoplusia*. A sequência de codificação do péptido pode ser clonada numa região não essencial do vírus, tal como o gene da poliedrina, e colocada sob o controlo do promotor da poliedrina. A inserção bem sucedida do péptido irá fazer com que o gene da poliedrina fique inactivo e produza vírus recombinantes aos quais lhes falte a proteína de revestimento. Os vírus recombinantes podem ser utilizados para infectar células de *S. frugiperda* ou larvas de *Trichoplusia* em que o péptido é expresso. Smith *et al.*, J. Virol. 46: 584 (1983); Engelhard *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 91: 3224-7 (1994).

Ainda de acordo com um outro exemplo, a sequência de ADn que codifica o péptido pode ser amplificada por PCR e clonada num vector adequado, por exemplo, pGEX-3X (Pharmacia). O vector pGEX está concebido para produzir uma proteína de fusão que contenha glutathione-S-transferase (GST), codificada pelo vector, e uma proteína codificada por um fragmento de ADN inserido no local de clonagem do vector. Os iniciadores para a PCR são gerados de modo a conterem, por exemplo, um local de clivagem conveniente. no caso de se utilizar a parcela de fusão apenas para facilitar a expressão ou se de alguma forma não for desejável o seu acoplamento ao péptido relevante, então a proteína de fusão recombinante pode ser clivada e retirada da parcela GST da proteína de fusão. O arquétipo peptídico pGEX-3X/agente de ligação específico é transformado em células de *E. coli* 'XL-1 Blue' (Stratagene, La Jolla CA),

tendo então lugar o isolamento e o crescimento dos transformantes individuais. É possível purificar o ADn plasmídico a partir dos transformantes individuais e sequenciá-lo parcialmente utilizando um sequenciador automatizado para conformar a presença do desejado agente de ligação específico que codifica a inserção de ácido nucleico com a orientação correcta.

Há determinadas composições peptídicas da presente invenção em que um peptidocorpo é conjugado com qualquer péptido antitumoral, tal como o factor da necrose tumoral (TNF). De acordo com um método particularmente preferencial, as quimeras peptídicas entre TNF-agente de ligação específico são geradas sob a forma de fusões recombinantes com sequências codificadoras de péptidos fundidas concatenadamente com as sequências que codificam o TNF (Novagen, Madison, WI). O ADNc do péptido-TNF pode ser clonado no vector pET-11b (Novagen) e a expressão de TNF-péptidos em BL21 *E. coli* pode ser induzida em conformidade com as instruções do fabricante de pET11b. Os produtos solúveis TNF-péptidos podem ser purificados a partir de lisados bacterianos por meio de uma preparação de sulfato de amónio, por cromatografia de interacção hidrofóbica sobre uma coluna Fenil-Sefarose '6 Fast Flow', por cromatografia de permuta iónica sobre uma coluna DEAE-Sefarose 'Fast Flow' e por cromatografia de filtração através de gel numa coluna 'Sephacryl-S- 300 HR'.

A proteína de fusão, que pode ser produzida na bactéria sob a forma de um corpo de inclusão insolúvel, pode ser purificada conforme a seguir se descreve. É possível sacrificar células hospedeiras por centrifugação, fazer a lavagem com NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1

mM; e efectuar o tratamento com lisozimas a 0,1 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 minutos à temperatura ambiente. É possível depurar o lisado por meio de ultrasounds e os resíduos celulares podem ser concentrados por centrifugação durante 10 minutos a 12000 X g. A massa centrifugada contendo a proteína de fusão pode ser recolocada em suspensão em Tris 50 mM, pH 8 e EDTA 10 mM, e aplicada como camada sobre glicerol a 50%, com a subsequente centrifugação durante 30 minutos a 6000 X g. a massa referida pode ser recolocada em suspensão numa solução salina convencional tamponada com fosfato (PBS) isenta de Mg^{++} e Ca^{++} . A proteína de fusão pode ainda ser purificada submetendo a massa recolocada em suspensão a um fraccionamento numa preparação de SDS-PAGE desnaturante (Sambrook *et al.*, *supra*). O gel pode ser embebido em KCl 0,4 M para se visualizar a proteína, que pode ser excisada e objecto de electroeluição em solução tampão de tratamento do gel à qual falte SDS. Se o produto GST/proteína de fusão fórmula geral produzido em bactérias sob a forma de um proteína solúvel, então pode ser purificado utilizando o módulo de purificação GST (Pharmacia).

A proteína de fusão pode ser submetida a digestão para clivar a GST, retirando-a do péptido da invenção. A mistura de reacção de digestão (20-40 mg de proteína de fusão, 20-30 unidades de trombina humana (4000 U/mg, Sigma)) em 0,5 mL de PBS, pode ficar a incubar durante 16 a 48 horas à temperatura ambiente e carregada num gel desnaturante de SDS-PAGE para fraccionamento dos produtos de reacção. O gel pode ser embebido numa solução de KCl 0,4 M para se visualizar as bandas proteínicas. A identidade da banda proteínica correspondentes ao peso molecular esperado do

péptido pode ser confirmada por análise das sequências de aminoácidos, utilizando um sequenciador automatizado (Applied Biosystems Model 473A, Foster City, CA). Em alternativa, a identidade pode ser confirmada submetendo os péptidos a HPLC e/ou espectrometria de massa.

Em alternativa, uma sequência de ADN que codifique o péptido pode ser clonada num plasmídeo que contenha o promotor desejado e, facultativamente, uma sequência líder [Better *et al.*, Science 240: 1041-43 (1988)]. A sequência deste arquétipo pode ser confirmada por sequenciação automática. O plasmídeo pode ser transformado depois utilizando para tal a estirpe MC1061 de *E. coli*, praticando procedimentos convencionais em que se utiliza a metodologia de incubação em CaCl_2 e o tratamento das bactérias por choque térmico (Sambrook *et al.*, *supra*). As bactérias transformadas podem desenvolver-se em meio LB enriquecido com carbenicilina e a produção da proteína expressa pode ser induzida por crescimento num meio conveniente. Se existir, a sequência líder pode efectuar a secreção do péptido e pode ser clivada durante a secreção.

A proteína recombinante segregada pode ser purificada a partir dos meios de cultura bacterianos, praticando os métodos adiante descritos.

Os sistemas hospedeiros de mamíferos para a expressão da proteína recombinante são perfeitamente conhecidos pelos especialistas na matéria. É possível escolher as estirpes de células hospedeiras em função de uma aptidão particular para processamento da proteína expressa ou para a produção de determinadas modificações pós-tradução que irão ser úteis para se obter a actividade da proteína. Tais modificações da proteína compreendem, mas sem que isso

constitua qualquer limitação, as seleccionadas entre acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação e acilação. Há diferentes tipos de células hospedeiras tais como as células CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38 e semelhantes que possuem uma maquinaria celular específica e mecanismos característicos para tais actividades pós-traducionais, podendo ser escolhidas de modo a garantirem a modificação e o processamento correctos da proteína exógena introduzida.

É preferível que as células transformadas sejam utilizadas a longo prazo, com uma produção proteínica de alto rendimento, sendo por isso desejável uma expressão estável. Logo que tais células tenham sido transformadas com vectores que contenham marcadores seleccionáveis conjuntamente com a cassette de expressão desejada, pode-se permitir que as células se desenvolvam durante 1 a 2 dias em meios enriquecidos antes de serem transferidas para meios selectivos. O marcador seleccionável é concebido de modo a conferir resistência à selecção e a sua presença permite o desenvolvimento e a recuperação de células em que tenha lugar a expressão com êxito das sequências introduzidas. É possível fazer proliferar os amontoados resistentes de células estavelmente transformadas utilizando técnicas de cultura de tecidos adequadas para tais células.

É possível utilizar diversos sistemas de selecção para recuperar as células que tenham sido transformadas para efeitos de produção de proteínas recombinantes. Tais sistemas de selecção, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os genes da timidina-cinase de HSV, hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase e adenina-fosforribosil-

transferase respectivamente em células tk, hgprt ou aprt. Também é possível utilizar a resistência anti-metabolitos como base para a selecção de DHFR que confere resistência ao metotrexato, gpt que confere resistência ao ácido micofenólico, neo que confere resistência ao aminoglicósido G418 e confere resistência à cloro-sulfurona e hygromycin que confere resistência à higromicina. Entre outros genes seleccionáveis suplementares que é possível utilizar refere-se o gene trpB que permite que as células utilizem indole em vez de triptofano ou o gene hisD que permite que as células utilizem histinol em vez de histidina. Entre os marcadores que permitem uma indicação visual para a identificação de transformantes refere-se as antocianinas, a β -glucuronidase e o seu substrato, GUS e a luciferase e seu substrato, a luciferina.

Purificação e desdobramento de agentes de ligação específicos

Em alguns casos pode ser necessário "desdobrar" e oxidar os agentes de ligação específicos, tais como os péptidos e/ou os peptídeos da presente invenção, para se obter uma estrutura terciária adequada e para gerar pontes dissulfureto para que fiquem biologicamente activos. O desdobramento pode ser realizado recorrendo a diversos métodos conhecidos na especialidade. Tais métodos compreendem, por exemplo, a exposição do agente polipeptídico solubilizado a um valor de pH normalmente superior a 7 na presença de um agente caotrópico. A selecção do agente caotrópico é semelhante às opções de selecção utilizadas para a solubilização de corpos de inclusão; no entanto, utiliza-se tipicamente um agente

caotrópico com uma concentração menor. Como exemplo de agente caotrópico refere-se a guanidina. Na maior parte dos casos, a solução de desdobramento/oxidação irá conter também um agente redutor mais a sua forma oxidada numa proporção específica que permita gerar um potencial redox particular que permita dismantelar as pontes dissulfureto para que tenha lugar a formação de pontes cisteína. Alguns pares redox vulgarmente utilizados são constituídos por cisteína/cistamina, glutathiona/ditiobisGSH, cloreto cúprico, ditiotreitól DTT/ditiano DTT e 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. Em muitos casos, é possível utilizar um co-solvente para aumentar a eficiência do desdobramento. Os co-solventes vulgarmente utilizados são o glicerol, o polietileno-glicol com diversos pesos moleculares e a arginina.

Eventualmente pode ser desejável purificar os péptidos e peptícorpos da presente invenção. As técnicas de purificação de proteínas são perfeitamente conhecidas pelos especialistas na matéria. Estas técnicas implicam, a um determinado nível, o fraccionamento bruto das fracções proteínicas e não proteínicas. Depois de se ter separado os péptidos e/ou os peptícorpos das outras proteínas, então os péptidos ou os peptícorpos relevantes podem ser ainda mais purificados por meio de técnicas cromatográficas e electroforéticas para se conseguir uma purificação parcial ou total (ou purificação até à homogeneidade). Os métodos analíticos particularmente convenientes para a preparação de peptícorpos e péptidos da presente invenção são seleccionados entre cromatografia de permuta iónica, cromatografia de exclusão, electroforese em gel de proliacrilamida e focagem isoeléctrica. Um método

particularmente eficiente para purificar péptidos é a cromatografia rápida em líquido proteico ou até mesmo HPLC.

Determinados aspectos da presente invenção dizem respeito à purificação e em casos particulares a uma purificação substancial de um péptido ou de um pepticorpo da presente invenção. O termo "pepticorpo ou péptido purificado", tal como aqui utilizado, tem por objecto qualificar uma composição, isolável relativamente a outros componentes, em que o pepticorpo ou o péptido é purificado até se obter qualquer grau relativamente ao seu estado susceptível de ser obtido naturalmente. Deste modo, um péptido ou um pepticorpo purificado é também um péptido ou um pepticorpo que está liberto do ambiente em que possa ocorrer naturalmente.

De um modo geral, o termo "purificado" serve para qualificar uma composição de péptidos ou de pepticorpos que tenha sido submetida a um fraccionamento para remover diversos outros componentes, conservando tal composição substancialmente a sua actividade biológica expressa. Quando se utiliza o termo "substancialmente purificado", tal designação qualifica uma composição de péptidos ou de pepticorpos em que esses péptidos ou pepticorpos constituem o componente principal da composição, por exemplo, constituem cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95% ou mais das proteínas existentes na composição.

Há diversos métodos para quantificar o grau de purificação dos péptidos ou pepticorpos, bem conhecidos pelos especialistas na matéria, à luz da presente descrição. Entre estes refere-se, por exemplo, a determinação da actividade de ligação específica de uma

fracção activa ou a avaliação da quantidade de péptidos ou peptícorpos existentes numa fracção por análise por SDS/PAGE. Um método preferencial para avaliar a pureza de uma fracção de péptidos ou de peptícorpos consiste em calcular a actividade de ligação da fracção para a comparar com a actividade de ligação do extracto inicial, assim se calculando o grau de purificação, aqui designado por "multiplicador de purificação". As unidades efectivas utilizadas para representar a quantidade de actividade de ligação irão depender, como é evidente, da técnica de análise particular escolhida para acompanhar a purificação e do facto de os peptícorpos ou péptidos exibirem ou não uma actividade de ligação detectável.

Há diversas técnicas convenientes para utilização na purificação e que são perfeitamente conhecidas pelos especialistas na matéria. Entre estas refere-se, por exemplo, a precipitação com sulfato de amónio, PEG, anticorpos (imunoprecipitação) e semelhantes ou por desnaturação térmica, seguindo-se uma centrifugação; passos cromatográficos, tais como a cromatografia por afinidade (v.g., Proteína-A-Sefarose), a cromatografia de permuta iónica, de filtração através de gel, de fase inversa, através de hidroxilapatite e por afinidade; a focagem isoeléctrica; a eletroforese em gel; e combinação destas e de outras técnicas. Conforme é geralmente sabido na especialidade, admite-se que a ordem de execução dos diversos passos de purificação pode ser alterada ou que determinados passos podem ser emitidos, praticando-se ainda assim um método adequado para a preparação de um agente de ligação específico substancialmente purificado.

Não há nenhuma exigência geral para que um péptido ou pepticorpo da presente invenção tenha de ser sempre obtido no seu estado mais purificado. Na realidade, antevê-se que em determinados casos possam ser úteis produtos de agentes de ligação específicos com menor grau de purificação. A purificação parcial pode ser efectuada praticando menos passos de purificação combinadamente ou utilizando formas diferentes do mesmo protocolo geral de purificação. Por exemplo, faz-se observar que uma cromatografia em coluna de permuta catiónica realizada utilizando um equipamento de HPLC irá originar geralmente um "multiplicador" de purificação maior do que a mesma técnica quando se utiliza um sistema de cromatografia a baixa pressão. Os métodos em que resulta um grau menor de purificação relativa podem ter vantagens na recuperação total do péptido ou do pepticorpo ou na manutenção da actividade de ligação do péptido ou do pepticorpo.

Sabe-se que a migração de um péptido ou de um polipéptido pode variar por vezes de forma significativa, com diferentes condições de SDS/PAGE [Capaldi *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 76: 425 (1977)]. Deste modo, convém salientar que em diferentes condições de electroforese podem variar os pesos moleculares aparentes de produtos de expressão de agentes de ligação específicos purificados ou parcialmente purificados.

Ensaaios de ligação

Nos ensaios de ligação imunológicos utiliza-se tipicamente um agente de captura que se liga especificamente ao antigénio relevante da substância analisável e que frequentemente o imobiliza. O agente de

captura é um radical que se liga especificamente à substância analisável. De acordo com uma variante da presente invenção, o agente de captura é um péptido ou um peptícorpo ou um seu fragmento que se liga especificamente a Ang-2. Estes ensaios de ligação imunológicos são perfeitamente conhecidos na especialidade [Asai, ed., *Methods in Cell Biology*, Vol. 37, *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc., New York (1993)].

Nos ensaios de ligação imunológicos utiliza-se frequentemente um agente identificador que irá assinalar a existência do complexo ligado formado pelo agente de captura e pelo antigénio. O agente identificador pode ser uma das moléculas que integram o complexo ligado, isto é, pode ser um agente de ligação específico identificado ou um anticorpo anti-agente de ligação específico identificado. Em alternativa, o agente identificador pode ser uma terceira molécula, vulgarmente um outro anticorpo, que se ligue ao complexo ligado. O agente identificador pode ser, por exemplo, um anticorpo anti-agente de ligação específico portador de um identificador.

Ao segundo anticorpo, específico para o complexo ligado, pode faltar-lhe um identificador, mas pode ser ligado por meio de uma quarta molécula específica para as espécies de anticorpos de que o segundo anticorpo é membro. Por exemplo, o segundo anticorpo pode ser modificado com um radical detectável, tal como a biotina, o qual pode ser depois ligado por meio de uma quarta molécula, tal como estreptavidina identificada com um enzima. Como agentes de identificação também é possível utilizar outras proteínas capazes de se ligarem especificamente a regiões constantes da imunoglobulina, tais como a proteína A ou a proteína G.

estas proteínas de ligação são constituintes normais das paredes celulares das bactérias estreptocócicas e revelam uma forte reactividade não imunogénica com regiões constantes da imunoglobulina provenientes de diversas espécies. Akerstrom, J. Immunol., 135: 2589-2542 (1985); Chaubert, Mod. Pathol., 10: 585-591 (1997).

Ao longo de todos os ensaios, podem ser necessários passos de incubação e/ou lavagem após cada combinação de reagentes. Os passos de incubação podem ter uma duração variável entre cerca de 5 segundos e várias horas, de preferência entre cerca de 5 minutos e cerca de 24 horas. No entanto, o período de incubação irá depender do protocolo de ensaio, da substância analisável, do volume da solução, das concentrações e não só. Normalmente, os ensaios irão ser realizados à temperatura ambiente, embora possam ser efectuados num intervalo amplo de temperaturas.

A. Ensaio de ligação não competitiva

Os ensaios de ligação imunológicos podem ser de tipo não competitivo. Estes ensaios prevêm uma quantidade de substância analisável capturada que é medida directamente. Por exemplo, no caso de se preferir um ensaio em "sanduíche", o agente de captura (anticorpo ou peptícorpo) pode ser ligado directamente a um substrato sólido onde fica imobilizado.

Estes agentes de captura imobilizados capturam então (ligam-se) o antigénio presente na amostra de ensaio. A proteína assim imobilizada é depois ligada a um agente identificador, tal como um segundo anticorpo que possua um identificador. Num outro ensaio preferencial em "sanduíche", ao segundo anticorpo falta-lhe um

identificador, mas pode ser ligado a um anticorpo identificado específico para anticorpos das espécies donde proveio o segundo anticorpo. O segundo anticorpo também pode ser modificado com um radical detectável, tal como a biotina, ao qual se pode ligar especificamente uma terceira molécula identificada, tal como a estreptavidina. Ver Harlow e Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cap. 14, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1988), obra aqui incorporada por referência.

B. Ensaaios de ligação competitiva

Os ensaios de ligação imunológica podem ser de tipo competitivo. A quantidade de substância analisável presente na amostra é medida indirectamente mediante a medição da quantidade de uma substância analisável acrescentada que foi deslocada, ou cujo acesso foi impedido, a partir de um agente de captura (anticorpo ou peptícorpo) pela substância analisável presente na amostra. De acordo com um ensaio de ligação competitiva preferencial, acrescenta-se à amostra uma quantidade conhecida da substância analisável, normalmente identificada, e depois faz-se contactar a amostra com o agente de captura. A quantidade de substância analisável identificada e ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da substância analisável presente na amostra (ver, Harlow e Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cap. 14, págs. 579-583, *supra*).

De acordo com um outro ensaio de ligação competitiva, o agente de captura é imobilizado sobre um substrato

sólido. A quantidade de proteína ligada ao agente de captura pode ser determinada quer medindo a quantidade de proteína presente num complexo de proteína/anticorpo, quer medindo, em alternativa, a quantidade de proteína remanescente que não participa no complexo. A quantidade de proteína pode ser detectada introduzindo uma proteína identificada. Harlow e Lane (*supra*).

Ainda de acordo mais um outro ensaio de ligação competitiva, recorre-se à inibição de hapteno. Neste caso, faz-se a imobilização de uma substância analisável conhecida sobre um substrato sólido. Acrescenta-se à amostra uma quantidade conhecida de anticorpo e faz-se contactar a amostra com a substância analisável imobilizada. A quantidade de anticorpo ligado à substância analisável imobilizada é inversamente proporcional à quantidade de substância analisável presente na amostra. A quantidade de anticorpo imobilizado pode ser detectada quer por detecção da fracção de anticorpo imobilizada quer da fracção que permanece em solução. A detecção pode ser directa, se o anticorpo estiver identificado, ou indirecta mediante a adição subsequente de um radical identificado que se ligue especificamente ao anticorpo, conforme descrito antes.

C. Utilização de ensaios de ligação competitiva

Os ensaios de ligação competitiva podem ser utilizados para determinações de interreactividade que permitam a um especialista na matéria determinar se um complexo proteínico ou enzimático que é reconhecido por um peptícorpo da invenção é efectivamente a proteína desejada e não uma molécula interreactiva, ou determinar se o

peptícorpo é específico para o antígeno e não se liga a antígenos não congêneres. Em ensaios deste tipo, o antígeno pode ser imobilizado num suporte sólido e acrescenta-se ao ensaio uma mistura proteínica desconhecida que irá competir com a ligação dos peptícorpos à proteína imobilizada. A molécula competitiva também se liga a um ou vários antígenos sem nenhuma relação com o antígeno. A aptidão das proteínas para competirem pela ligação dos peptícorpos ao antígeno imobilizado é comparada com a ligação efectuada pela mesma proteína que foi imobilizada sobre o suporte sólido para se determinar a interreactividade da mistura proteínica.

D. Outros ensaios de ligação

A presente invenção também prevê os métodos 'Western blot' para detectar ou quantificar a presença de Ang-2 numa amostra. Esta técnica compreende geralmente a separação das proteínas da amostra por electroforese em gel, com base no peso molecular, e a transferência das proteínas para um suporte sólido adequado, tal como um filtro de nitrocelulose, um filtro de nylon ou um filtro de nylon transformado. Mantém-se a amostra a incubar com os peptícorpos ou seus fragmentos que se liguem especificamente a Ang-2 e faz-se a detecção do complexo resultante. Estes peptícorpos podem ser identificados directamente ou então, em alternativa, podem ser detectados depois utilizando anticorpos identificados que se liguem especificamente ao peptícorpo.

Ensaio de diagnóstico

Os agentes de ligação transformados, tais como os péptidos e peptícorpos ou seus fragmentos, da presente

invenção são úteis para o diagnóstico de patologias ou de doenças caracterizadas pela expressão de subunidades de Ang-2, ou em ensaios analíticos para monitorizar pacientes que estejam a ser tratados com indutores de Ang-2, seus fragmentos, agonistas ou inibidores da actividade de Ang-2. Os ensaios de diagnóstico para Ang-2 compreendem métodos em que se utiliza um peptícorpo e um identificador para detectar Ang-2 em fluidos do corpo humano ou em extractos de células ou tecidos. Os peptícorpos da presente invenção podem ser utilizados com ou sem modificação. De acordo com um ensaio de diagnóstico preferencial, os peptícorpos irão ser identificados mediante a fixação, v.g., de um identificador ou de uma molécula repórter. É conhecido um grande número de identificadores e de moléculas repórteres, tendo alguns sido já aqui descritos. Em particular, a presente invenção é útil para o diagnóstico de doenças dos seres humanos.

São conhecidos na especialidade diversos protocolos para medir proteínas de Ang-2 utilizando peptícorpos específicos para a respectiva proteína. Como exemplos refere-se o ensaio imunossorvente ligado a enzimas (ELISA) os radioimunoensaios (RIA) e a selecção de células activadas por fluorescência (FACS). É preferível um imunoensaio de base monoclonal bi-local, utilizando anticorpos monoclonais reactivos com dois epítomos na Ang-2 não interferentes, mas pode ser praticado um ensaio de ligação competitiva. Estes ensaios analíticos estão descritos, por exemplo, em Maddox et al., J. Exp. Med., 158: 1211 (1983).

Com o intuito de se obter uma base para diagnóstico, são definidos normalmente valores normais ou convencionais

para a expressão de Ang-2 humana. Esta determinação pode ser executada combinando fluidos corporais ou extractos celulares provenientes de indivíduos normais, de preferência seres humanos, com um peptícorpo para Ang-2, em condições convenientes para a formação de complexos perfeitamente conhecidos na especialidade. É possível quantificar a formação de complexo convencional comparando a ligação dos peptícorpos com quantidades conhecidas de proteína Ang-2, com amostras quer de substância de controlo quer de material patológico. Depois, os valores convencionais obtidos a partir de amostras normais podem ser comparados com os valores obtidos a partir de amostras de indivíduos potencialmente afectados pela doença. O desvio observado entre os valores convencionais e os do indivíduo sugerem a existência de uma função desempenhada por Ang-2 na situação patológica.

Para aplicações de diagnóstico, em determinados casos, os peptícorpos ou os péptidos da presente invenção irão ser identificados tipicamente com um radical detectável. O radical detectável pode ser qualquer um capaz de produzir, quer directa quer indirectamente, um sinal detectável. Por exemplo, o radical detectável pode ser um radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I , um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como o isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; ou uma enzima, tal como a fosfatase alcalina, β -galactosidase ou peroxidase do rábano-silvestre. Bayer et al., Meth. Enz., 184: 138-163, (1990).

Patologias

A presente invenção proporciona um agente de ligação, tal como um péptido, um peptícorpo ou um seu fragmento, variante ou derivado, que se ligue a Ang-2 para utilização no tratamento de doenças e estados patológicos dos seres humanos. Os agentes que modulem a actividade de ligação de Ang-2, ou outra actividade celular, podem ser utilizados em combinação com outros agentes terapêuticos para aumentar os seus efeitos terapêuticos ou para diminuir potenciais efeitos secundários.

De acordo com um aspecto, a presente invenção proporciona reagentes utilizáveis em métodos úteis para tratar doenças e estados patológicos caracterizados por níveis indesejáveis ou aberrantes de actividade de Ang-2 numa célula. Entre estas doenças refere-se os cancros e outras patologias hiperproliferativas, tais como hiperplasia, psoríase, dermatite de contacto, doenças imunológicas e infertilidade.

A presente invenção também é útil em métodos para o tratamento de cancro num animal, incluindo os seres humanos, os quais consistem em administrar ao animal uma quantidade eficaz de um agente de ligação específico, tal como um peptícorpo, que iniba ou faça diminuir a actividade de Ang-2. A invenção é útil em métodos de inibição do desenvolvimento de células cancerosas, incluindo os processos de proliferação celular, invasividade e metástases em sistemas biológicos. Tais métodos prevêm a utilização de um composto da invenção enquanto inibidor do desenvolvimento das células cancerosas. De preferência, os métodos são utilizados para inibir ou reduzir o desenvolvimento de células cancerosas, invasividade, metástases ou incidência tumoral em animais vivos, tais

como os mamíferos. Os métodos em que a invenção é útil também são facilmente adaptáveis para utilização em sistemas de ensaio, v.g., em ensaios de pesquisa de desenvolvimento de células cancerosas e suas propriedades, e também para identificar compostos que afectem o desenvolvimento de células cancerosas.

Os cancros que é possível tratar pelos métodos em que a presente invenção é útil, ocorrem preferencialmente em mamíferos. Entre os mamíferos, refere-se, por exemplo, os seres humanos e outros primatas, e também os animais domésticos ou de companhia, tais como cães e gatos, animais de laboratório, tais como ratos, murganhos e coelhos, e animais produtivos de criação, tais como equídeos, suínos, ovinos e bovinos.

Os tumores ou os neoplasmas resultam do crescimento de células de tecido em que a multiplicação celular está descontrolada e é progressiva. Alguns destes crescimentos são benignos, mas outros são considerados malignos e podem levar à morte do organismo. Os neoplasmas malignos ou cancros distinguem-se dos crescimentos benignos pelo facto de poderem invadir os tecidos adjacentes e poderem produzir metástases, para além de revelarem uma proliferação celular agressiva. Além do mais, os neoplasmas malignos caracterizam-se pelo facto de apresentarem uma maior perda de diferenciação (maior desdiferenciação) e da sua organização relativamente uns aos outros e aos tecidos que lhes estão adjacentes. Esta propriedade também é designada por "anaplasia".

Os neoplasmas tratáveis pela presente invenção compreendem também os tumores sólidos, isto é, carcinomas e sarcomas. Os carcinomas compreendem os neoplasmas malignos

resultantes de células epiteliais que se infiltram (invadem) os tecidos adjacentes e dão origem a metástases. Os adenocarcinomas são carcinomas resultantes de tecidos glandulares, ou que formem estruturas glandulares reconhecíveis. Uma outra categoria ampla de cancros compreende os sarcomas que são tumores cujas células se encontram fixadas e introduzidas numa substância fibrilar ou homogénea, tal como o tecido conjuntivo embrionário. A invenção também permite o tratamento de cancros dos sistemas mielóide e linfóide, incluindo as leucemias, linfomas e outros cancros que tipicamente não se encontram presentes numa massa tumoral, estando antes distribuídos nos sistemas vascular e linforetico.

Os tipos de cancro de células tumorais, propícios para o tratamento de acordo com a invenção, compreendem, por exemplo, os seleccionados entre tumor produtor de ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia não linfocítica aguda, cancro do córtex renal, cancro da bexiga, cancro cerebral, cancro da mama, cancro cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cancro colorrectal, linfoma de células T cutâneo, cancro endometrial, cancro do esófago, sarcoma de Ewing, cancro da vesícula biliar, leucemia das células filamentosas, cancro da cabeça e do pescoço, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cancro do rim, cancro do fígado, cancro do pulmão (de células pequenas e não pequenas), efusão peritoneal maligna, efusão pleural maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiplo, neuroblastoma, glioma, linfoma de tipo não Hodgkin, osteossarcoma, cancro dos ovários, cancro das células germinativas dos ovários, cancro pancreático, cancro do pénis, cancro da próstata, retinoblastoma, cancro da pele,

sarcoma dos tecidos moles, carcinomas de células escamosas, cancro do estômago, cancro testicular, cancro da tiróide, neoplasmas trofoblásticos, cancro do útero, cancro vaginal, cancro da vulva e tumor de Wilms.

A invenção é aqui particularmente ilustrada tomando como referência a utilização no tratamento de determinados tipos de cancros definidos experimentalmente. Nestes tratamentos ilustrativos, foram utilizados modelos convencionais *in vitro* e *in vivo* em conformidade com o estado da técnica. Estes métodos podem ser utilizados para identificar agentes para os quais se preveja que são eficazes em regimes de tratamento *in vivo*. No entanto, faz-se observar que a utilização do método da invenção não se limita ao tratamento destes tipos de tumores, podendo ser aplicado a qualquer tumor sólido oriundo de qualquer sistema orgânico. Os cancros cuja invasividade ou metástases estejam associadas à expressão ou à actividade de Ang-2 são especialmente propícios para serem inibidos ou para que haja uma regressão induzida por meio da presente invenção.

A invenção também pode ser praticada incorporando conjuntamente com um composto da invenção, por exemplo, um peptícorpo, em combinação com um outro agente quimioterapêutico anti-cancro, por exemplo, qualquer agente quimioterapêutico convencional. A combinação de um agente de ligação específico com tais agentes de outro tipo pode potenciar o protocolo quimioterapêutico. Há inúmeros protocolos quimioterapêuticos que são do conhecimento dos especialistas na matéria e que podem ser incorporados no método da invenção. É possível utilizar quaisquer agentes quimioterapêuticos, incluindo os agentes de alquilação,

antimetabolitos, hormonas e antagonistas, radioisótopos e também produtos naturais. Por exemplo, o composto da invenção pode ser administrado com antibióticos, tais como doxorubicina e outros análogos de antraciclina, mostardas azotadas, tais como ciclofosfamida, análogos de pirimidina tais como 5-fluorouracilo, cisplatina, hidroxiureia, taxol e os seus derivados naturais e sintéticos e não só. De acordo com um outro exemplo, no caso de tumores complexos, tais como o adenocarcinoma da mama, em que os tumores contêm células dependentes da gonadotropina e células independentes da gonadotropina, o composto pode ser administrado em conjunto com leuprólido ou goserelina (péptidos sintéticos análogos de LH-RH). Há outros protocolos antineoplásicos que compreendem a utilização de um composto de tetraciclina com uma outra modalidade de tratamento, v.g., cirurgia, radiação, etc., também aqui designadas por "modalidades antineoplásicas adjuntas". Assim, o método da invenção pode ser aplicado com tais regimes convencionais, com o benefício de haver uma redução dos efeitos secundários e um aumento da eficácia.

Deste modo, a presente invenção proporciona composições e a sua utilização em métodos úteis para o tratamento de uma grande variedade de cancros, incluindo os tumores sólidos e as leucemias. Os tipos de cancro que podem ser tratados compreendem, mas sem isso constitua qualquer limitação: adenocarcinoma da mama, próstata e cólon; todas as formas de carcinomas pulmonares broncogénicos; mielóides; melanomas; hepatomas; neuroblastomas; papilomas; apudomas; coristomas; branquiomas, síndrome carcinóide maligno; doença cardíaca carcinóide; carcinomas (v.g., de Walker, das células

basais, basoscamosos, Brown-Pearce, ductais, tumor de Ehrlich, de Krebs 2, das células de Merkel, mucinosos, pulmonares das células não pequenas, das células pequenas, papilares, cirrosos, bronquiolares, broncogénicos, das células escamosas e das células de transição); doenças histiocíticas; leucemia; histiocitose maligna; doença de Hodgkin; carcinoma pulmonar das células pequenas imunoproliferativas; linfoma de tipo não Hodgkin; plasmacitoma; reticuloentoteliose; melanoma; condroblastoma; condroma; condrossarcoma; fibroma; fibrossarcoma; tumores das células gigantes; histiocitoma; lipoma; lipossarcoma; mesotelioma; mixoma; mixossarcoma; osteoma; osteossarcoma; cordoma, craniofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma; mioossarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma; timoma e tumor trofoblástico. Além disso, também é possível tratar os seguintes tipos de cancros: adenoma; colangioma; colesteatoma; ciclindroma; cistadenocarcinoma; cistadenoma; tumor das células granulosas; ginandroblastoma; hepatoma; hidradenoma; tumor das células dos ilhéus; tumor das células de Leydig; papiloma; tumor das células de Sertoli; tumor das células de teca; leiomioma; leiomioossarcoma; mioblastoma; mioma; mioossarcoma; rabdomioma; rabdioossarcoma; ependimoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepitiloma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma não cromafim; angioceratoma; hiperplasia angiolinfóide com eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatose; glomangioma; hemangioendoteliona; hemangioma; hemanglopericitoma; hemangioossarcoma; linfangioma; linfangiomoma; linfangioossarcoma; pinealoma; carcinossarcoma;

condrossarcoma; cistossarcoma; filódio; fibrossarcoma; hemangiossarcoma; leiomiossarcoma; leucossarcoma; linfangiossarcoma; miossarcoma; mixossarcoma; carcinoma dos ovários; rabdomiossarcoma; sarcoma; neoplasmas; nerofibromatoses e displasia cervical.

De acordo com um outro dos seus aspectos, a presente invenção prevê a utilização de materiais e a sua aplicação em métodos da presente invenção para evitar e/ou tratar todas as patologias da pele hiperproliferativas, incluindo a psoríase e a dermatite de contacto ou outras doenças hiperproliferativas. Foi já demonstrado que os pacientes com psoríase e com dermatite de contacto apresentam uma elevada actividade de Ang-2 associada a estas lesões [Ogoshi *et al.*, J. Invenção Dermatol., 110:818-23 (1998)]. De preferência, os agentes de ligação específicos para a Ang-2 irão ser utilizados em combinação com outros agentes farmacêuticos para tratar seres humanos que revelem estes sintomas clínicos. Os agentes de ligação específicos podem ser administrados, recorrendo a qualquer dos diversos veículos, através das vias de administração aqui descritas e de outras que são perfeitamente conhecidas pelos especialistas na matéria.

Outros aspectos da presente invenção compreendem a utilização no tratamento de diversas retinopatias (incluindo a retinopatia diabética e degeneração macular associada à idade) em que está implicada a angiogénese, estando também previsto o tratamento de patologias/doenças do tracto reprodutor das mulheres, tais como a endometriose, fibróides uterinos e outras patologias deste tipo associadas à proliferação vascular disfuncional

(incluindo o crescimento microvascular do endométrio) durante o ciclo reprodutivo da mulher.

Ainda de acordo com um outro aspecto da presente invenção, prevê-se a sua utilização no tratamento do crescimento vascular anormal, incluindo as malformações arteriovenosas cerebrais (AVM), a reparação e o tratamento de lesões da mucosa gastrintestinal, o tratamento da ulceração da mucosa gastroduodenal em pacientes com uma história de doença de úlcera péptica, incluindo a isquemia resultante de um ataque cardíaco, o tratamento de um grande espectro de patologias vasculares pulmonares com doença hepática e hipertensão da veia porta em pacientes com hipertensão da veia porta não hepática.

Um outro aspecto da presente invenção prevê a sua utilização na prevenção de cancros, utilizando as composições e os métodos proporcionados pela presente invenção. Tais reagentes irão incluir os agentes de ligação específicos, tais como os peptícorpos contra Ang-2.

Composições farmacêuticas

As composições farmacêuticas contendo agentes de ligação específicos de Ang-2, tais como os peptícorpos, estão abrangidas no âmbito da presente invenção. As composições farmacêuticas contendo anticorpos estão descritas pormenorizadamente, por exemplo, na patente de invenção norte-americana nº 6 171 586 de Lam *et al.*, datada de 9 de Janeiro de 2001. Tais composições compreendem uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um agente de ligação específico, tal como um anticorpo, ou os seus fragmentos, variantes, derivados ou produtos de fusão, conforme aqui descrito, em mistura com um agente

farmaceuticamente aceitável. De acordo com uma variante preferencial, as composições farmacêuticas compreendem agentes de ligação específicos de antagonistas que modelam parcial ou totalmente pelo menos uma actividade biológica de Ang-2, misturados com um agente farmaceuticamente aceitável. De uma forma típica, os agentes de ligação específicos irão ser suficientemente purificados para serem administrados a um animal.

A composição farmacêutica pode conter materiais de formulação para modificar, manter ou conservar, por exemplo, os valores de pH, osmolaridade, viscosidade, transparência, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, velocidade de dissolução ou libertação, adsorção ou penetração da composição. Os materiais de formulação adequados compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os seleccionados entre aminoácidos (tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tais como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou hidrogeno-sulfito de sódio); tampões (tais como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos e outros ácidos orgânicos); agentes para aumentar o volume (tais como o manitol ou a glicina), agentes quelantes [tais como ácido etilenodiamina-tetraacético (EDTA)]; agentes complexantes (tais como cafeína, polivinil-pirrolidona, β -ciclodextrina ou hidroxipropil- β -ciclodextrina); cargas; monossacarídeos; dissacarídeos e outros hidratos de carbono (tais como glicose, manose ou dextrinas); proteínas (tais como albumina do soro, gelatina ou imunoglobulinas); agentes corantes; agentes aromatizantes e diluentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrofílicos (tais como polivinil-pirrolidona);

polipéptidos de baixo peso molecular; iões simétricos formadores de sais (tais como o sódio); conservantes (tais como cloreto de benzalcónio, ácido benzóico, ácido salicílico, timorosal, álcool fenetílico, metil-parabeno, propil-parabeno, cloro-hexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogénio); solventes (tais como glicerina, propileno-glicol ou polietileno-glicol); álcoois de açúcares (tais como o manitol ou o sorbitol); agentes de suspensão; agentes tensioactivos ou humectantes (tais como 'plurronics', PEG, ésteres de sorbitano, polissorbatos, tais como o polissorbato 20, o polissorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes intensificadores da estabilidade (sacarose ou sorbitol); agentes intensificadores da tonicidade (tais como os halogenetos de metais alcalinos (de preferência os cloretos de sódio ou potássio, manitol e sorbitol); veículos para administração; diluentes; excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edição, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

A composição farmacêutica óptima irá ser determinada por um especialista na matéria em função, por exemplo, da via de administração pretendida, do protocolo de administração e da dosagem desejada. Ver por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*. Tais composições podem influenciar o estado físico, a estabilidade, a velocidade de libertação *in vivo* e a velocidade de depuração *in vivo* do agente de ligação específico.

O veículo ou portador primário numa composição farmacêutica pode ser de natureza aquosa ou não aquosa, por exemplo, um veículo ou portador conveniente pode ser a água para injeções, uma solução salina fisiológica ou fluido

cerebrospinal artificial, eventualmente enriquecido com outros materiais vulgares em composições para administração parentérica. Os solutos salinos tamponados neutros ou os solutos salinos misturados com albumina do soro são outros exemplos de veículos. Outros exemplos de composições farmacêuticas contêm o tampão Tris a valores de pH entre 7,0-8,5 aproximadamente, ou o tampão acetato a valores de pH entre 4,0-5,5 aproximadamente, podendo também conter sorbitol ou um substituto adequado para o efeito. De acordo com uma variante da presente invenção, é possível preparar as composições de agentes de ligação para armazenagem, misturando a composição seleccionada, com o grau desejado de pureza, com agentes de formulação facultativos (Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*) na forma de uma massa liofilizada ou de uma solução aquosa. Além disso, o produto de agente de ligação pode ser formulado sob a forma de um liofilizado, utilizando para tal excipientes adequados, tais como a sacarose.

As composições farmacêuticas podem ser seleccionadas para administração parentérica. Em alternativa, as composições podem ser seleccionadas para inalação ou para administração entérica, tais como as aplicadas pelas vias oral, auricular, oftálmica, rectal ou vaginal. A preparação de tais composições farmacêuticamente aceitáveis é da competência de especialistas na matéria.

Os componentes de formulação encontram-se presentes com concentrações que são aceitáveis no local de administração. Por exemplo, são utilizados tampões para se manter a composição com valores de pH fisiológicos ou ligeiramente inferiores, tipicamente num intervalo de valores de pH entre cerca de 5 e cerca de 8.

No caso de estar prevista a administração parentérica, as composições terapêuticas para utilização na presente invenção podem assumir a forma de soluções aquosas parentericamente aceitáveis, isentas de pirogénios, contendo o desejado agente de ligação específico num veículo farmacêuticamente aceitável. Um veículo particularmente conveniente para injeção parentérica é a água destilada estéril, em que um agente de ligação é formulado sob a forma de uma solução isotónica estéril, convenientemente conservada. Há ainda uma outra preparação que pode implicar a formulação da molécula desejada com um agente, por exemplo, microsferas injectáveis, partículas biodegradáveis, compostos poliméricos (poliácido láctico, poliácido glicólico), esférulas ou lipossomas, que contribuam para uma libertação controlada ou sustentada do produto que pode ser então administrado por meio de um artefacto implantável. Também é possível utilizar o ácido hialurónico, podendo este ter o efeito de favorecer a duração prolongada na circulação. Outros meios convenientes para a introdução da molécula desejada compreendem os dispositivos implantáveis para a administração de fármacos.

Ainda de acordo com um outro aspecto, as composições farmacêuticas adequadas para administração parentérica podem ser formuladas em soluções aquosas, de preferência em soluções tampão fisiologicamente compatíveis, tais como a solução de Hanks, a solução de Ringer ou soluto salino fisiologicamente tamponado. As suspensões aquosas para injeção podem conter substâncias que aumentem a viscosidade da suspensão, tais como carboximetil-celulose sódica, sorbitol ou dextrano. Adicionalmente, as suspensões dos compostos activos podem ser preparadas sob a forma de

suspensões oleosas para injeção, conforme adequado. Os solventes ou veículos lipofílicos convenientes compreendem os óleos gordos, tais como o óleo de sésamo, ou os ésteres de ácidos gordos sintéticos, tais como oleato de etilo, triglicéridos ou lipossomas. Os polímeros de amino policatiónicos não lipídicos também podem ser utilizados para administração. Facultativamente, a suspensão também pode conter agentes estabilizadores adequados ou agentes para aumentar a solubilidade dos compostos e permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

De acordo com uma outra variante, as composições farmacêuticas podem ser formuladas para inalação. Por exemplo, é possível formular um agente de ligação como pó anidro para inalação. As soluções de moléculas polipeptídicas ou de ácidos nucleicos para inalação também podem ser formuladas com um agente propulsor para administração como aerossol. Ainda de acordo com uma outra variante, as soluções podem ser nebulizadas. A administração por via pulmonar está descrita melhor no pedido de patente de invenção PCT com o nº PCT/US941001575, que descreve a administração pulmonar de proteínas quimicamente modificadas.

Também está previsto que determinadas formulações possam ser administradas por via oral. De acordo com uma variante da presente invenção, as moléculas de agente de ligação que são administradas desta maneira podem ser formuladas com ou sem os veículos vulgarmente utilizados na preparação de formas de dosagem sólida, tais como comprimidos e cápsulas. Por exemplo, é possível produzir uma cápsula para libertar a parte activa da formulação num determinado ponto do tracto gastrointestinal onde a

biodisponibilidade seja maximizada e a degradação pré-sistêmica minimizada. É possível incorporar outros agentes para facilitar a absorção da molécula de agente de ligação. Também é possível utilizar diluentes, aromatizantes, ceras de baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes desintegradores de comprimidos e aglutinantes.

As composições farmacêuticas para administração oral também podem ser formuladas utilizando veículos farmacêuticamente aceitáveis perfeitamente conhecidos na especialidade em doses convenientes para administração oral. Tais veículos permitem formular as composições farmacêuticas como comprimidos, drageias, cápsulas, líquidos, geles, xaropes, pastas, suspensões e semelhantes, para ingestão pelo paciente.

As preparações farmacêuticas para utilização oral podem ser obtidas combinando os compostos activos com excipientes sólidos e transformando a mistura resultante em grânulos (facultativamente após cominuição) para se obter núcleos para comprimidos ou drageias. É possível acrescentar adjuvantes adequados, se desejado. Os excipientes adequados compreendem os hidratos de carbono ou cargas proteínicas, tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol e sorbitol; amido de milho, trigo, arroz, batata ou de outras plantas; celulose, por exemplo, metilcelulose, hidroxipropil-metil-celulose ou carboximetil-celulose sódica; gomas, incluindo a goma arábica e a goma de alcantira; e proteínas, tais como gelatina e colagénio. Se desejado, é possível acrescentar agentes desintegradores ou solubilizadores, tais como polivinil-pirrolidona

reticulada, ágar e ácido algínico ou um seu sal, tal como o alginato de sódio.

Os núcleos das drageias podem ser utilizados em conjunto com revestimentos convenientes, por exemplo, soluções de açúcar concentradas, que também podem conter goma arábica, talco, polivinil-pirrolidona, gel de carbopol, polietileno-glicol e/ou dióxido de titânio, soluções de laca e solventes orgânicos adequados ou misturas de solventes. É possível acrescentar corantes ou pigmentos aos revestimentos dos comprimidos ou das drageias para identificação do produto ou para caracterizar a quantidade de composto activo, isto é, a dosagem.

As preparações farmacêuticas que podem ser utilizadas por via oral compreendem também as cápsulas de encaixe feitas de gelatina e também as cápsulas moles estanques feitas de gelatina e de um revestimento, por exemplo, glicerol ou sorbitol. As cápsulas de encaixe podem conter ingredientes activos misturados com cargas ou aglutinantes, tais como lactose ou amidos, lubrificantes, tais como talco ou estearato de magnésio, e facultativamente agentes estabilizadores. Nas cápsulas moles, os compostos activos podem ser dissolvidos ou estar em suspensão em líquidos adequados, tais como óleos gordos, líquidos ou polietileno-glicol líquido, com ou sem agentes estabilizadores.

Uma outra composição farmacêutica pode conter uma quantidade eficaz de um agente de ligação misturado com excipientes não tóxicos adequados para a produção de comprimidos. Dissolvendo os comprimidos em água estéril, ou noutro veículo adequado, é possível preparar soluções na forma de doses unitárias. Os excipientes adequados compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação,

diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato ou bicarbonato de sódio, lactose ou fosfato de cálcio; ou agentes aglutinantes, tais como amido, gelatina ou goma de acácia; ou agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

Há outras composições farmacêuticas que são evidentes para os especialistas na matéria, incluindo as formulações que contêm as moléculas de agente de ligação em formulações de administração prolongada ou controlada. Os especialistas na matéria conhecem também as técnicas para formular uma grande variedade de outros sistemas de administração prolongada ou controlada, tais como veículos lipossômicos, micropartículas biodegradáveis ou esférulas porosas e artefactos implantáveis. Ver, por exemplo, o documento PCT/US93/00829 que descreve a libertação controlada de micropartículas poliméricas porosas para a administração de composições farmacêuticas. Outros exemplos de preparações de libertação prolongada compreendem as matrizes poliméricas semipermeáveis, enquanto elementos com uma forma própria, *v.g.*, películas ou microcápsulas. As matrizes de libertação prolongada podem conter poliésteres, hidrogeles, polilactídeos (U.S. 3 773 919, EP 58 481), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ -etil-L-glutamato [Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22:547-556 (1993)], poli(2-hidroxietil-metacrilato) [Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981)] e [Langer *et al.*, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)], vinil-acetato de etileno (Langer *et al.*, *supra*) ou poli(ácido D(-)-hidroxibutírico) (EP 133 988). As composições de libertação prolongada contêm também lipossomas, cuja preparação pode ser feita em conformidade com métodos conhecidos na especialidade. Ver, *v.g.*,

Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:3688-3692 (1985); EP 36 676; EP 88 046; EP 143 949.

A composição farmacêutica utilizável para administração *in vivo* deve ser tipicamente estéril. Isto pode ser conseguido por filtração através de membranas filtrantes estéreis. No caso de a composição ser liofilizada, a esterilização executada de acordo com este método pode ser efectuada quer antes quer após a liofilização e reconstituição. As composições para administração parentérica podem ser guardadas na forma liofilizada ou em solução. Além disso, as composições parentéricas são colocadas, geralmente, num recipiente que possui uma abertura de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa que possui uma rolha perfurável por meio de uma agulha de injeção hipodérmica.

Depois de a composição farmacêutica ter sido formulada, pode ser guardada sob a forma de uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou pó desidratado ou liofilizado em frascos estéreis. Tais formulações podem ser guardadas quer numa forma pronta para utilização quer numa forma reconstituível (v.g., liofilizada) antes da administração.

De acordo com uma variante específica, a presente invenção prevê também estojos para a produção de uma unidade de administração de uma dose única. Cada um destes estojos pode ter, simultaneamente, um primeiro recipiente onde, esteja contida a proteína anidra, e um segundo recipiente, onde esteja contida uma formulação aquosa. Também estão abrangidos, no âmbito da presente invenção, os estojos que contenham seringas pré-carregadas com câmaras

múltiplas ou únicas (v.g., seringas com líquidos e liooseringas).

A quantidade eficaz de uma composição farmacêutica que irá ser utilizada terapeuticamente vai depender, por exemplo, do contexto e objectivos terapêuticos. Um especialista na matéria sabe que os níveis de dosagem apropriados para tratamento irão, conseqüentemente, variar, em parte, em função da molécula administrada, a patologia para a qual foi prescrita a molécula de agente de ligação, a via de administração e a corpulência (massa corporal, superfície corporal ou tamanho do órgão) e estado geral (idade e saúde genérica) do paciente. Assim sendo, o médico assistente pode titular a dosagem e modificar a via de administração para conseguir obter um efeito terapêutico óptimo. Uma dosagem típica irá estar compreendida entre cerca de 0,1 mg/kg e cerca de 100 mg/kg ou mais, dependendo disso dos factores supramencionados. De acordo com outras variantes, a dosagem pode estar compreendida entre cerca de 0,1 mg/kg e cerca de 100 mg/kg; ou entre 1 mg/kg e cerca de 100 mg/kg; ou entre 5 mg/kg e cerca de 100 mg/kg.

Para qualquer composto, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente, quer em ensaios de culturas celulares quer em modelos com animais, tais como murganhos, ratos, coelhos, cães, suínos ou macacos. Também é possível utilizar o modelo com animais para determinar o intervalo de concentrações e a via de administração convenientes. Tal informação pode ser utilizada depois para determinar doses úteis e vias de administração em seres humanos.

A dosagem exacta irá ser determinada à luz de factores relacionados com o paciente que necessite de tratamento. A dosagem e a administração são ajustadas para conferirem

níveis suficientes do composto activo ou para se manter o efeito desejado. Os factores que podem ser tomados em consideração compreendem a gravidade do estado patológico, o estado geral de saúde do paciente, a sua idade, massa corporal e o género desse paciente, o período e a frequência de administração, as combinações de fármacos, a sensibilidade a reacções e a resposta à terapia. As composições farmacêuticas de actuação prolongada podem ser administradas em cada 3 a 4 dias, semanalmente ou quinzenalmente, dependendo disso do período de semi-vida e da velocidade de depuração da formulação particular.

A frequência de dosagem irá depender dos parâmetros farmacocinéticos da molécula do agente de ligação existente na formulação utilizada. De uma forma típica, administra-se uma composição até que se atinja uma dosagem que proporcione o efeito desejado. Assim, a composição pode ser administrada numa dose única, ou em doses múltiplas (com concentrações iguais ou diferentes/dosagens) ao longo do tempo, ou como uma infusão contínua. Podem ser feitos rotineiramente outros refinamentos da dosagem adequada. As dosagens adequadas podem ser estabelecidas recorrendo à utilização de dados adequados de tipo dose-resposta.

A via de administração da composição farmacêutica está de acordo com métodos conhecidos, v.g., oralmente, por injeção pelas vias intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intra-arterial, intra-auricular, intralesional, por aplicações pelas vias intramedular, intratecal, intraventricular, transdermal, subcutânea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, uretral, vaginal ou rectal, por meio de

sistemas de libertação prolongada ou por meio de dispositivos de implantação. Se desejado, as composições podem ser administradas por injeção em *bolus* ou por infusão contínua ou por meio de um dispositivo de implantação.

Em alternativa ou complementarmente, a composição pode ser administrada localmente mediante a implantação de uma membrana, esponja ou qualquer outro material adequado no qual a molécula desejada tenha sido absorvida ou encapsulada. No caso de se utilizar um dispositivo de implantação, então o dispositivo pode ser implantado num tecido ou órgão conveniente e a administração da molécula desejada pode ser feita por difusão, por meio de *bolus* de libertação cronometrada ou por administração contínua.

Em alguns casos, pode ser desejável utilizar composições farmacêuticas de uma maneira *ex vivo*. Em tais casos, as células, os tecidos ou os órgãos que tenham sido removidos do paciente são expostos às composições farmacêuticas e subsequentemente tais células, tecidos e/ou órgãos são novamente implantados no paciente.

Noutros casos, é possível administrar um agente de ligação da presente invenção, tal como um peptícorpo, implantando determinadas células que tenham sido manipuladas geneticamente, utilizando métodos tais como os aqui descritos, para expressão e secreção do polipéptido. Tais células podem ser de origem animal ou humana e podem ser autólogas, heterólogas ou xenogeneicas. Facultativamente, as células podem ser imortalizadas. Para se fazer diminuir a possibilidade de haver uma resposta imunológica, as células podem ser encapsuladas para se evitar a infiltração em tecidos adjacentes. Os materiais de

encapsulação são tipicamente membranas ou invólucros poliméricos biocompatíveis e semipermeáveis que permitem a libertação dos produtos proteínicos mas que impedem a destruição das células pelo sistema imunitário do paciente ou por outros factores prejudiciais provenientes dos tecidos adjacentes.

Combinação de terapias

Os agentes de ligação específicos da presente invenção, tais como os peptícorpos, podem ser utilizados em combinação com outras terapêuticas no tratamento de doenças associadas à expressão de Ang-2. Estas e outras terapêuticas compreendem, por exemplo, os tratamentos por radiação, quimioterapia e terapias dirigidas, tais como Herceptim™, Rituxan™, Gleevec™ e não só. Há outras combinações de terapias que não estão aqui especificamente enumeradas, mas que também estão abrangidas no âmbito da presente invenção.

O tratamento quimioterapêutico pode utilizar agentes antineoplásicos, compreendendo, por exemplo, agentes de alquilação, incluindo: mostardas azotadas, tais como meclor-etamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano e clorambucil; nitro-ureias, tais como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) e semustina (metil-CCNU); etileniminas/metilmelamina, tais como trietilenomelamina (TEM), trietileno, tiofosforamida (tiotepa), hexametil-melamina (HMM, altretamina); sulfonatos de alquilo, tais como bussulfano; triazinas, tais como dacarbazina (DTIC); antimetabolitos, incluindo os análogos do ácido fólico, tais como metotrexato e trimetrexato, análogos de pirimidina, tais como 5-fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, gem-citabina, citosina, arabinosido (AraC, citarabina), 5-

azacitidina, 2,2'-difluorodesoxicitidina, análogos de purina, tais como 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritro-hidroxi-noniladenina (EHNA), fosfato de fludarabina e 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA); produtos naturais incluindo os fármacos antimitóticos, tais como paclitaxel, alcalóides de vinca, incluindo vinblastina (VLB), vincristina e vinorelbina, taxotere, estramustina e fosfato de estramustina; pipodofilotoxinas, tais como etoposido e teniposido; antibióticos, tais como actimomicina D, daunomicina (rubidomicina), doxorubicina, mitoxantrona, idarrubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C e actinomicina; enzimas, tais como L-asparaginase; modificadores de resposta biológica, tais como interferão α , IL-2, G-CSF e GM-CSF; agentes diversos, incluindo os complexos de coordenação de platina, tais como cisplatina e carboplatina, antracenosionas, tais como mitoxantrona, ureia substituída, tal como hidroxiureia, derivados de metil-hidrazina, incluindo N-metil-hidrazina (MIH) e procarbazona, supressores adrenocorticais, tais como mitotano (o,p'-DDD) e aminoflutetimida; hormonas e antagonistas, incluindo antagonistas adrenocorticosteróides, tais como prednisona e equivalentes, dexametasona e aminoglutetimida; progestina, tal como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona e acetato de megestrol, estrogénios, tais como dietil-estilbestrol e equivalentes de etinil-estradiol; antiestrogénios, tais como tamoxifeno; androgénios, incluindo propionato de testosterona e equivalentes de fluoximesterona; antiandrogénios, tais como flutamida, análogos da hormona libertadora de gonadotropina e

leuprólido; e antiandrogénios não esteroidais, tais como flutamida.

Uma combinação de terapias com factores de crescimento pode conter citoquinas, linfoquinas, factores de crescimento ou outros factores hematopoiéticos, tais como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF α , TNF β , G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombopoietina, factor das células estaminais e eritropoietina. Outras composições podem conter angiopoietinas conhecidas, por exemplo, Ang-1, -2, -4, -Y, e/ou o polipéptido semelhante a Ang humana e/ou o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF). Os factores de crescimento compreendem angiogenina, proteína 1 morfogénica dos ossos, proteína 2 morfogénica dos ossos, proteína 3 morfogénica dos ossos, proteína 4 morfogénica dos ossos, proteína 5 morfogénica dos ossos, proteína 6 morfogénica dos ossos, proteína 7 morfogénica dos ossos, proteína 8 morfogénica dos ossos, proteína 9 morfogénica dos ossos, proteína 10 morfogénica dos ossos, proteína 11 morfogénica dos ossos, proteína 12 morfogénica dos ossos, proteína 13 morfogénica dos ossos, proteína 14 morfogénica dos ossos, proteína 15 morfogénica dos ossos, receptor IA da proteína morfogénica dos ossos, receptor IB da proteína morfogénica dos ossos, factor neurotrófico derivado do cérebro, factor neurotrófico ciliar, receptor do factor neurotrófico ciliar, factor 1 quimiotáctico neutrófilo induzido pela citoquina, neutrófilo induzido pela citoquina, factor 2 quimiotáctico, factor 2 quimiotáctico neutrófilo induzido pela citoquina, factor de crescimento das células endoteliais, endotelina 1, factor de crescimento epidermal, o atraente de

neutrófilos derivado do epitélio, factor 4 de crescimento dos fibroblastos, factor 5 de crescimento dos fibroblastos, factor 6 de crescimento dos fibroblastos, factor 7 de crescimento dos fibroblastos, factor 8 de crescimento dos fibroblastos, factor 8b de crescimento dos fibroblastos, factor 8c de crescimento dos fibroblastos, factor 9 de crescimento dos fibroblastos, factor 10 de crescimento dos fibroblastos, factor ácido de crescimento dos fibroblastos, factor básico de crescimento dos fibroblastos, receptor 1 do factor neutrófico derivado da linhagem de células gliais, receptor 2 do factor neutrófico derivado da linhagem de células gliais, proteína associada ao crescimento, proteína 1 associada ao crescimento, proteína 2 associada ao crescimento, proteína 3 associada ao crescimento, factor de crescimento epidermal de ligação da heparina, factor de crescimento dos hepatócitos, receptor do factor de crescimento dos hepatócitos, factor 1 de crescimento de tipo insulínico, receptor do factor de crescimento de tipo insulínico, factor 2 de crescimento de tipo insulínico, proteína de ligação do factor de crescimento de tipo insulínico, factor de crescimento dos ceratinócitos, factor inibidor de leucemia, receptor 1 do factor inibidor de leucemia, factor de crescimento dos nervos, receptor do factor de crescimento dos nervos, neurotrofina 3, neurotrofina 4, factor de crescimento da placenta, factor 2 de crescimento da placenta, factor de crescimento das células endoteliais derivadas de plaquetas, factor de crescimento derivado de plaquetas, cadeia do factor A de crescimento derivado de plaquetas, factor AA de crescimento derivado de plaquetas, factor AB de crescimento derivado de plaquetas, cadeia do factor B de crescimento

derivado de plaquetas, factor BB de crescimento derivado de plaquetas, receptor 1 do factor de crescimento derivado de plaquetas, receptor 2 do factor de crescimento derivado de plaquetas, factor estimulador do crescimento de pré-células B, factor das células estaminais, receptor do factor das células estaminais, factor 1 do crescimento transformante, factor 2 do crescimento transformante, factor 1,2 do crescimento transformante, factor 3 do crescimento transformante, factor 5 do crescimento transformante, factor 1 do crescimento transformante latente, proteína I de ligação do factor 1 do crescimento transformante, proteína II de ligação do factor 1 do crescimento transformante, proteína III de ligação do factor 1 do crescimento transformante, receptor de tipo I do factor da necrose tumoral, receptor de tipo II do factor da necrose tumoral, receptor do activador do plasminogénio de tipo urocinase, factor de crescimento endotelial vascular e proteínas quiméricas e seus fragmentos biológica ou imunologicamente activos.

Imunoterapêutica

A imunoterapêutica assenta geralmente na utilização de células e moléculas imunoefectoras para visar e destruir células cancerosas. Os efectores imunitários podem ser, por exemplo, um pepticorpo da presente invenção que reconheça algum marcador sobre a superfície de uma célula destinatária. O péptido pode servir só por si como um efector de terapia ou pode congrega outras células para efectuarem realmente a aniquilação celular. O pepticorpo também pode ser conjugado com um fármaco ou com uma toxina (quimioterapêutica, um radionuclídeo, a cadeia da ricina A,

a toxina da cólera, a toxina da tosse convulsa, etc.) e consequentemente pode servir apenas como agente de encaminhamento.

De acordo com a presente invenção, as formas mutantes de Ang-2 podem ser encaminhadas quer por peptícorpos imunoterapêuticos quer por conjugados de peptícorpos da invenção. Prevê-se, particularmente, que as composições de peptícorpos da invenção possam ser utilizadas numa metodóloga de terapia combinada em conjunto com uma terapia subordinada a Ang-2.

Verificou-se que a imunoterapia passiva é particularmente eficaz contra diversos cancros. Ver, por exemplo, o documento WO 98/39027.

Os exemplos seguintes têm apenas fins ilustrativos e não devem ser considerados, de forma alguma, como limitativos do âmbito da invenção.

Exemplo 1

Expressão de Ang-2 em tecidos patológicos e em tecidos normais

Examinou-se a expressão de Ang-2 em tecidos normais e em tecidos patológicos, recorrendo à hibridação *in situ*. Foram utilizados fragmentos das sequências de Ang-2 humanas (número de admissão AF004327 no Genbank, nucleótidos 1274-1726) e de murinos (número de admissão AF004326 do Genbank, nucleótidos 1135-1588) que foram amplificados por PCR com transcriptase inversa a partir de ADNc pulmonar fetal dos seres humanos ou de murinos, clonado no plasmídeo pGEM-T e cuja verificação foi feita sequenciação. As sondas hibridantes de ARN anti-sentido marcadas com ³³P foram transcritas a partir das matrizes de plasmídeo linearizadas

utilizando ^{33}P -UTP e polimerase de ARN. Foram utilizados blocos de tecidos embebidos em parafina e estabilizados com formaldeído que foram seccionados a 5 μm e que foram depois colocados sobre lamelas com carga eléctrica. Antes da hibridação *in situ*, os tecidos foram permeabilizados com HCL 0,2M, seguindo-se a digestão com a proteinase K e a acetilação com trietanolamina e anidrido acético. As secções foram hibridadas com a sonda hibridante, radioidentificada, de um dia para o outro a 55°C e depois foram submetidas a digestão com RNase e a uma operação de lavagem em condições altamente rigorosas em meio 0,1 X SSC a 55°C. As lamelas foram mergulhadas em emulsão NTB2 da Kodak, expostas a 4°C durante 2-3 semanas, reveladas e contrastadas. As referidas secções foram examinadas em campo escuro e com iluminação convencional para se conseguir uma avaliação simultânea da morfologia tecidual e do sinal de hibridação.

Os resultados indicaram que a expressão de Ang-2 pós-natal, em tecidos humanos normais, está limitada a alguns tecidos que contêm vasculatura angiogénica, tais como os tecidos de ovário, placenta e útero. Não foi detectável nenhuma expressão de Ang-2 nos tecidos de adultos humanos normais de órgãos como coração, cérebro, rim, fígado, pulmão, pâncreas, baço, músculos, amígdalas, timo, apêndice, nodos linfáticos, vesícula biliar, próstata ou testículos. Nos murganhos com cinco semanas de idade (mas não nos macacos ou nos seres humanos adultos), os rins manifestaram uma expressão notável de Ang-2 nos *vasa recta*. Para se determinar se a expressão correspondia aos restos do desenvolvimento embrionário, repetiu-se esta experiência com rins de murganhos com idades até um ano, utilizando a

sonda hibridante de Ang-2 de murinos e as condições enumeradas antes. Verificou-se que a expressão de Ang-2 diminuía durante o desenvolvimento neonatal, mas era ainda evidente nos rins dos murganhos com um ano de idade.

Detectou-se também a expressão de Ang-2 praticamente em todos os tipos de tumores testados, incluindo os tumores humanos primários, tais como o carcinoma do cólon (5 casos), carcinoma mamário (10 casos), carcinoma pulmonar (8 casos), glioblastoma (1 caso), tumores humanos metastáticos, tais como o carcinoma mamário (2 casos), carcinoma pulmonar (2 casos) e carcinoma dos ovários (2 casos) cujas metástases haviam alcançado o cérebro, e também nos modelos de tumores de roedores, tais como C6 (glioma do rato), HT29 (carcinoma do cólon humano), Colo-205 (carcinoma do cólon humano), HCT116 (carcinoma do cólon humano), A431 (carcinoma epidermóide humano), A673 (rabdomyossarcoma humano), HT1080 (fibrossarcoma humano), PC-3 (carcinoma prostático humano), B16F10 (melanoma dos murinos), MethA (sarcoma dos murinos) e carcinoma pulmonar de Lewis. Além disso, a expressão de Ang-23 foi detectada na neovasculatura em desenvolvimento numa vela de Matrigel em resposta a VEGF e no modelo de hipoxia do murganho com retinopatia de prematuridade.

Exemplo 2

Ensaio molecular para avaliar peptídeos de Ang-2

Foram desenvolvidos ensaios moleculares (ELISA por afinidade, ELISA de neutralização e BIAcore) para se avaliar a ligação directa de peptídeos a Ang-2 e membros de famílias congéneres e para se avaliar também o efeito

dos peptícorpos sobre a interacção Ang-2:Tie-2. Estes ensaios *in vitro* estão descritos a seguir.

Protocolo 'ELISA' de afinidade

Para a despistagem inicial de peptícorpos anti-Ang-2 elegíveis utilizou-se Ang-2 humana purificada (R&D Systems, Inc; número de catalogo 623-NA; a Ang-2 foi fornecida sob a forma de uma mistura de duas versões truncadas) ou o polipéptido de Ang-2 dos murinos (preparado conforme se disse anteriormente). Para os ensaios de ligação de confirmação, a Ang-2 humana foi obtida a partir de meios condicionados de células 293T humanas transfectadas com ADN de Ang-2 humana de comprimento completo, criadas em cultura em meio de Eagle modificado por Dulbecco e isento de soro (DMEM), contendo albumina do soro de bovino (BSA) na concentração de cerca de 50 µg /mL.

Utilizando placas de microtitulação, acrescentou-se a cada cavidade das placas aproximadamente 100 µL de Ang-2 e depois manteve-se as placas a incubar durante cerca de 2 horas, após o que se fez a lavagem das placas com soluto salino tamponado com fosfato (PBS) contendo cerca de 0,1% de Tween-20, quatro vezes. As placas foram então bloqueadas introduzindo em cada cavidade cerca de 250 µL de soluto contendo cerca de 5% de BSA em PBS e depois manteve-se as placas a incubar à temperatura ambiente durante cerca de 2 horas. Após a incubação, deitou-se fora o excesso de solução de bloqueio e acrescentou-se a cada cavidade cerca de 100 µL de cada um dos peptícorpos anti-Ang-2 elegíveis, de acordo com uma diluição em série começando com uma concentração de cerca de 40 nanomolar e prosseguindo então com uma razão sequencial de redução da concentração de 4

vezes em PBS contendo cerca de 1% de BSA. Depois manteve-se as placas a incubar de um dia para o outro à temperatura ambiente. Após a incubação, efectuou-se a lavagem das placas com PBS contendo cerca de 0,1% de Tween-20. Repetiu-se a lavagem durante mais quatro vezes, após o que se introduziu em cada cavidade 100 µL de anti-IgG(Fc) humana conjugada na cabra com HRP (Pierce Chemical Co., número de catálogo 31416) previamente diluída à razão de 1:5000 em PBS contendo 1% de BSA. Manteve-se as placas a incubar durante aproximadamente 1 hora à temperatura ambiente. Depois efectuou-se a lavagem das placas 5 vezes com PBS contendo cerca de 0,1% de Tween-20, após o que se acrescentou a cada cavidade cerca de 100 µL de TBM (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, sistema de substrato líquido; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, número de catálogo T8665) e a seguir manteve-se as placas a incubar durante cerca de 5-15 minutos até ter surgido uma cor azul. Depois efectuou-se a leitura da absorvência num espectrómetro a cerca de 370 nm.

Protocolo 'ELISA' de neutralização

Efectuou-se a preparação de placas de microtitulação onde se encontrava ligado o polipéptido de Ang-2 humana, conforme descrito para o protocolo de ELISA por afinidade. Os peptícorpos anti-Ang-2 elegíveis foram titulados a valores entre 1000 nM e 0,2 pM em diluições sequenciais diminuindo à razão de 4 vezes numa solução de PBS contendo cerca de 1% de BSA e cerca de 1 nM de Tie-2 (fornecido como molécula Tie-2-Fc em que a parcela Tie-2 continha apenas a parte extracelular solúvel da molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Depois acrescentou-se a cada cavidade

cerca de 100 μ L de solução contendo anticorpo/Tie-2, manteve-se as placas a incubar de um dia para o outro à temperatura ambiente e a seguir efectuou-se a sua lavagem 5 vezes em PBS contendo cerca de 0,1% de Tween-20. Após a lavagem, acrescentou-se a cada cavidade cerca de 100 μ L de anticorpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., número de catálogo 557039), até se obter uma concentração final de cerca de 1 μ g/mL e manteve-se as placas a incubar durante cerca de 1 hora à temperatura ambiente. Seguidamente, acrescentou-se a cada cavidade cerca de 100 μ L de anti-IgG de murganho conjugado na cabra com HRP (Pierce Chemical CO., número de catálogo 31432) com uma diluição de 1:10000 em PBS contendo cerca de 1% de BSA. Manteve-se as placas a incubar à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora, após o que foram lavadas 5 vezes com PBS contendo cerca de 0,1% de Tween-20. Depois introduziu-se em cada cavidade cerca de 100 μ L de substrato de TMB (descrito *supra*) e esperou-se pelo aparecimento de uma cor. A seguir mediu-se a absorvência num espectrómetro a 370 nm.

Protocolo 'BIAcore' de afinidade

Realizou-se a análise de afinidade de cada peptícorpo de Ang-2 elegível, segundo a metodologia 'BIAcore®2000' (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) com PBS e contendo 0,005% de agente tensioactivo P20 (Biacore, Inc.), enquanto tampão de funcionamento. Fez-se a imobilização de proteína G recombinante (Repligen, Needham, MA), até ao limite de pesquisa de qualidade do microcircuito sensor CM5 (Biacore, Inc.), através dos grupos amina primários, utilizando para tal o estojo de acoplamento de aminas 'Amine Coupling Kit

(Biacore, Inc.), em conformidade com o protocolo sugerido pelo fabricante.

Os ensaios de ligação foram realizados fazendo capturar, em primeiro lugar, cerca de 100 Ru de cada um dos peptícorpos anti-Ang-2 elegíveis, pela proteína G imobilizada, após o que se injectou diversas concentrações (0-100 nM) de huAng-2 ou mAng-2 sobre a superfície do anticorpo ligado, com um caudal de 50 μ L/minuto durante 3 minutos. Efectuou-se a determinação dos parâmetros cinéticos de ligação do peptícorpo, incluindo as constantes k_a (constante de velocidade de associação), k_d (constante de velocidade de dissociação) e K_D (constante de equilíbrio de dissociação), utilizando para tal o programa informático 3.1 de avaliação BIA (Biacore, Inc.). As constantes de equilíbrio de dissociação de menor valor indicam uma maior afinidade do peptícorpo para a Ang-2.

Exemplo 3

Identificação de péptidos de ligação de Ang-2

1. Preparação de esférulas magnéticas recobertas com Ang-2

A. Imobilização de Ang-2 sobre esférulas magnéticas

Para a eluição não específica, efectuiu-se a imobilização da proteína Ang-2 biotinilada (Biotinylated Recombinant Human Angiopoietin-2, R&D Systems, Inc.; número de catálogo BT 623) sobre 'Streptavidin Dynabeads' (Dynal, Lake Success, NY), para uma concentração de cerca de 4 μ g da proteína Ang-2 biotinilada por cada 100 μ L de esférulas provenientes directamente do fabricante para a totalidade das três experiências de selecção. Para as eluições de

antigénio (Ang-2) e de receptor (Tie-2), efectuou-se a imobilização de 2 µg de proteína Ang-2 biotinilada sobre 50 µL de 'Streptavidin Dynabeads' durante a segunda experiência de selecção. Reduziu-se a concentração do revestimento para cerca de 1 µg de proteína Ang-2 biotinilada por cada 50 µL das referidas esférulas para a terceira experiência de selecção. Fazendo deslocar as esférulas para um lado do tubo por meio de um íman e retirando o líquido com uma pipeta, efectuou-se a lavagem das esférulas cinco vezes com o soluto salino tamponado com fosfato (PBS), tendo sido depois recolocadas em suspensão em PBS. Acrescentou-se a proteína Ang-2 biotinilada às esférulas lavadas, com a concentração indicada antes, e manteve-se tudo a incubar com rotação durante 1 hora à temperatura ambiente, seguindo-se algumas horas de incubação de um dia para o outro a 4°C, com rotação. As esférulas recobertas com Ang-2 foram depois bloqueadas, acrescentando BSA até à concentração final aproximada de cerca de 15% e mantendo tudo a incubar de um dia para o outro a 4°C, com rotação. As esférulas resultantes, recobertas com Ang-2, foram depois lavadas cinco vezes com PBS, antes de terem sido submetidas a procedimentos de selecção.

B. Preparação de esférulas para selecção negativa

Efectuou-se também a preparação de outras esférulas para selecções negativas. Para cada caso criteriosamente seleccionado, submeteu-se 500 µL de esférulas provenientes directamente do fabricante ao procedimento supramencionado (secção 1A), com a excepção de se ter omitido o passo de incubação com a Ang-2 biotinilada. No último passo de

lavagem, as esférulas foram divididas em 5 aliquotas de 100 μ L.

2. Selecção do fago de ligação de Ang-2

A. Estratégia geral

Foram utilizados 3 bibliotecas de fagos filamentosos, designadas por "TN8-IX" (5×10^9 transformantes independentes), "TN12-I" (1.4×10^9 transformantes independentes) e "Linear" (2.3×10^9 transformantes independentes) (todos da Dyax Corp.) para efeitos de selecção dos fagos de ligação de Ang-2. Cada biblioteca foi submetida quer a eluição não específica, eluição com Ang-2 e eluição com receptor (Tie-2). Foram analisados nove casos diferentes criteriosamente seleccionados para Ang-2 (TN8-IX, utilizando o método de eluição não específica, TN8-IX utilizando o método de eluição com Ang-2, TN8-IX utilizando o método de eluição com Tie-2, TN12-I utilizando o método de eluição não específico, TN12-I utilizando o método de eluição com Ang-2 e TN12-I utilizando o método de eluição com Tie-2, 'Linear' utilizando o método de eluição não específica, 'Linear' utilizando o método de eluição com Ang-2 e 'Linear' utilizando o método de eluição com Tie-2). Para a totalidade das três bibliotecas, os fagos da primeira experiência de selecção foram objecto de eluição apenas de uma maneira não específica para posteriores experiências de selecção. Foram praticadas as eluições com Ang-2 e Tie-2 na segunda e na terceira experiências de selecção. No caso da biblioteca 'Linear', a selecção foi efectuada apenas para a segunda experiência para as eluições com Ang-2 e Tie-2.

B. Selecção negativa

Para cada caso criteriosamente seleccionado, distribuiu-se por aliquotas cerca de 100 equivalentes aleatórios de bibliotecas, para as bibliotecas TN8-IX e TN12-I (cerca de 5×10^{11} ufp para TN8-IX e cerca de $1,4 \times 10^{11}$ ufp para TN12-I) e cerca de 10 equivalentes aleatórios de bibliotecas, para a biblioteca 'Linear' (cerca de 1×10^{11} ufp), a partir do lote disponível de biblioteca, tendo sido feita uma diluição para cerca de 400 μ L com PBST (PBS com 0,05% de Tween-20). Após a última lavagem, retirou-se líquido da primeira aliquota de 100 μ L e efectuou-se a preparação das esférulas para selecção negativa (secção 1B), tendo sido acrescentados às esférulas aproximadamente 400 μ L do lote disponível de biblioteca diluída. Manteve-se a mistura resultante a incubar durante cerca de 10 minutos à temperatura ambiente, com rotação. Removeu-se o sobrenadante dos fagos, utilizando o íman, e acrescentou-se à segunda aliquota de 100 μ L para a realização de um outro passo de selecção negativa. Foram executados desta maneira cinco passos de selecção negativa.

C. Selecção utilizando as esférulas recobertas com a proteína Ang-2

Após o último passo de selecção negativa (secção 1B), acrescentou-se o sobrenadante dos fagos às esférulas recobertas com Ang-2 (secção 1A). Manteve-se esta mistura a incubar, com rotação, durante 1 a 2 horas à temperatura ambiente, permitindo que os fagos se ligassem à proteína relevante. Depois de se ter deitado fora o sobrenadante, efectuou-se a lavagem das esférulas durante cerca de 10 minutos com PBST, seguindo-se duas lavagens com PBS.

D. Eluição não específica

Após a lavagem final, removeu-se o líquido (secção 2C) e acrescentou-se às esférulas cerca de 1 mL de solução com sais 'Min A' (K_2HPO_4 60 mM, KH_2PO_4 33 mM, $(NH_4)SO_4$ 7,6 mM e citrato de sódio 1,7 mM). Acrescentou-se esta mistura directamente a uma amostra bacteriana concentrada, para infecção (ver adiante, secções 3A e 3B).

E. Eluição do fago ligado com o antigénio (Ang-2)

Na segunda experiência, após o último passo de lavagem (secção 2C), os fagos ligados foram objecto de eluição a partir das esférulas magnéticas, mediante a adição de 100 μ L de proteína Ang-2 recombinante nas concentrações de 1 pM, 0,1 nM e 10 nM (Recombinant Human Angiopoietin-2, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota), sucessivamente, com um período de incubação de 30 minutos para cada caso. Os fagos remanescentes foram objecto de eluição, de forma não específica (secção 2D). Os fagos eluídos, provenientes das eluições não específicas a 10 nM, foram combinados e depois foram submetidos à terceira experiência de selecção (ver a secção 4, *infra*).

Na terceira experiência, após o último passo de lavagem (secção 2C), os fagos ligados foram objecto de eluição a partir das esférulas magnéticas, mediante a adição de cerca de 1 nM de proteína Ang-2 recombinante e 10 nM de proteína Ang-2 recombinante, sucessivamente, com um período de incubação de 30 minutos para cada caso. Além disso, os fagos foram objecto de eluição com 1 mL de solução de trietilamina 100 mM (Sigma, St. Louis, Missouri) durante cerca de 10 minutos, numa centrifugadora. Efectuou-

se a neutralização do pH da solução de trietilamina que continha os fagos, utilizando para tal 0,5 mL de Tris-HCl 1 M (pH 7,5). Após a última eluição com a solução de trietilamina 100 mM, efectuou-se a eluição dos fagos remanescentes, mediante a adição de esférulas às bactérias (secção 2D).

F. Eluição dos fagos ligados ao receptor (Tie-2)

Na segunda experiência, após o último passo de lavagem (secção 2C), os fagos ligados foram objecto de eluição a partir das esférulas magnéticas, mediante a adição de cerca de 100 μ L de proteína Tie-2 recombinante 1 pM, 0,1 nM e 10 nM (Recombinant Human Tie-2-Fc Chimera, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota), sucessivamente, com um período de incubação de 30 minutos para cada caso. Os fagos remanescentes foram objecto de eluição não específica (secção 2D). Os fagos eluídos provenientes das eluições não específicas 10 nM, foram combinados e depois foram submetidos à terceira experiência de selecção (ver a secção 4 *infra*).

No caso da terceira experiência, após o último passo de lavagem (secção 2C), os fagos ligados foram objecto de eluição a partir das esférulas magnéticas mediante a adição de cerca de 1 nM de proteína Ang-2 recombinante e 10 nM de proteína Tie-2 recombinante, sucessivamente, com um período de incubação de 30 minutos para cada caso. Além disso, os fagos foram objecto de eluição com 1 mL de solução de trietilamina 100 mM (Sigma, St. Louis, Missouri) durante cerca de 10 minutos, numa centrífugadora. Efectuou-se a neutralização do pH da solução de trietilamina que continha os fagos, utilizando para tal 0,5 mL de Tris-HCl 1 M (pH

7,5). Após a última eluição com a solução de trietilamina 100 mM, efectuou-se a eluição dos fagos remanescentes mediante a adição de esférulas às bactérias (secção 2D).

3. Amplificação

A. Preparação de células para cobertura de placas

Manteve-se uma cultura recente de *E. coli* (XL-1 Blue MRF') em desenvolvimento até se obter um valor de DO₆₀₀ igual a cerca de 0,5 em meios 'LB' contendo tetraciclina na concentração de 12,5 µg/mL. Para cada caso criteriosamente seleccionado, arrefeceu-se sobre gelo cerca de 20 mL desta cultura e depois centrifugou-se. A massa de bactérias obtida foi recolocada em suspensão em cerca de 1 mL de solução de sais 'Mini A'.

B. Transdução

Cada mistura proveniente de cada um dos diferentes métodos de eluição descritos antes (secções 2D, 2E e 2F) foi acrescentada a uma amostra de bactérias concentradas (secção 3A) e manteve-se a incubar a cerca de 37°C durante cerca de 15 minutos. Acrescentou-se a cada mistura aproximadamente 2 mL de meios NZCYM (2XNZCYM, ampicilina a 50 µg/mL) e manteve-se a incubar a cerca de 37°C durante 15 minutos. Com os 4 mL de solução resultantes efectuou-se a cobertura de uma placa grande de ágar em meio NZCYM contendo ampicilina na concentração de 50 µg/mL e manteve-se a incubar de um dia para o outro a 37°C.

C. Colheita de fagos

Cada mistura de bactérias/fagos ficou a desenvolver-se de um dia para o outro sobre uma placa grande de ágar em meio NZCYM (secção 3B), tendo sido retirados delas extractos que foram introduzidos em cerca de 35 mL de meios 'LB'. Cada placa de ágar foi ainda enxaguada com mais 35 mL de meios 'LB'. A mistura resultante de bactérias / fagos nos meios 'LB' foi centrifugada para concentrar e afastar as bactérias. A seguir transferiu-se aproximadamente 50 mL do sobrenadante dos fagos para um novo tubo e acrescentou-se cerca de 12,5 mL de solução de PEG (20% de PEG 8000, acetato de amónio 3,5 M) e manteve-se a incubar sobre gelo durante 2 horas para fazer precipitar os fagos. Os fagos precipitados foram centrifugados e recolocados em suspensão em 6 mL de tampão renovado de suspensão de fagos (NaCl 250 mM, Tris 100 mM, pH 8, EDTA 1 mM). A solução de fagos foi ainda purificada por centrifugação que permitiu remover as bactérias remanescentes, tendo tido lugar a precipitação dos fagos pela segunda vez mediante a adição de cerca de 1,5 mL de solução de PEG. Após o passo de centrifugação, recolocou-se a massa de fagos em suspensão em cerca de 400 µL de PBS. Submeteu-se esta solução a um passo de centrifugação final para libertar a solução de quaisquer resíduos bacterianos remanescentes. Efectuou-se a titulação da preparação de fagos resultante, recorrendo para tal a ensaios convencionais de formação de placas.

4. Selecção e Amplificação suplementares

Na segunda experiência, a preparação de fagos amplificados (cerca de 10^{10} ufp) proveniente da primeira experiência (secção 3C), foi utilizada como carga de fagos para a realização dos passos de selecção e amplificação

(secções 2 e 3). Para as eluições de Ang-2 e Tie-2, os fagos provenientes das eluições a 10 nM e não específicas foram combinados e amplificados para a terceira experiência de selecção. A preparação de fagos amplificados (cerca de 10^9 ufp), proveniente da segunda experiência, foi utilizada, por sua vez, como carga de fagos para a realização dos passos de selecção e amplificação da terceira experiência (secções 2 e 3). A seguir aos passos de eluição (secções 2D, 2E e 2F) da terceira experiência, utilizou-se uma pequena fracção dos fagos eluídos, a qual foi aplicada sobre uma placa, tal como no ensaio de formação de placas (secção 3C). Foram retirados extractos de cada uma das placas e depois foram colocados em placas de microtitulação de 96 cavidades, contendo cada uma delas 100 µL de tampão 'TE'. Estas placas principais ficaram a incubar a 4°C de um dia para o outro para permitir que tivesse lugar a eluição dos fagos no tampão 'TE'.

5. Análise clonal

Os clones de fagos foram analisados pelo protocolo ELISA para fagos e pela sequenciação de ADN. As sequências foram ordenadas com base nos resultados combinados, obtidos a partir destes dois ensaios.

A. Protocolo 'ELISA' para fagos

Manteve-se uma cultura de XL-1 Blue MRF' em desenvolvimento até se obter um valor de DO_{600} igual a cerca de 0,5. Distribuiu-se cerca de 30 µL desta cultura em aliquotas em cada uma das cavidades de uma placa de microtitulação de 96 cavidades. Acrescentou-se a cada cavidade cerca de 10 µL de fagos eluídos (secção 4) e

permitiu-se que infectassem bactérias durante cerca de 15 minutos à temperatura ambiente. Acrescentou-se a cada cavidade cerca de 100 µL de meios 'LB' contendo tetraciclina na concentração aproximada de 12,5 µg/mL e ampicilina na concentração aproximada de 50 µg/mL. A placa de microtitulação ficou depois a incubar, com agitação, de um dia para o outro a cerca de 37°C. Esperou-se que a proteína Ang-2 recombinante (cerca de 1 µg/mL em PBS) se ligasse às placas Maxisorp de 96 cavidades (NUNC) de um dia para o outro a cerca de 4°C. Como controlo, aplicou-se estreptavidina pura sobre uma placa Maxisorp independente, com uma concentração de cerca de 2 µg/mL em PBS.

No dia seguinte, deitou-se fora o líquido existente nas placas Maxisorp recobertas com a proteína e bloqueou-se cada cavidade com cerca de 300 µL de solução de leite a 5% a cerca de 4°C de um dia para o outro (em alternativa, 1 hora à temperatura ambiente). Depois deitou-se fora a solução de leite e efectuou-se a lavagem das cavidades três vezes com a solução de PBST. Após o último passo de lavagem, acrescentou-se 50 µL da solução de PBST com leite a 4% a cada cavidade das placas Maxisorp recobertas com a proteína. Utilizou-se cerca de 50 µL das culturas, desenvolvidas de um dia para o outro, de cada cavidade da placa de microtitulação de 96 cavidades, tendo sido feita a sua transferência para as correspondentes cavidades de placas recobertas com Ang-2 e também para as placas de controlo recobertas com estreptavidina. Deitou-se fora o líquido das placas Maxisorp e efectuou-se a lavagem das cavidades cerca de três vezes com PBST. O anticorpo anti-M13 conjugado com HRP (Amersham Pharmacia Biotech) foi diluído para cerca de 1:7500 e acrescentou-se cerca de 100

μL da solução diluída a cada cavidade das placas Maxisorp para uma incubação de aproximadamente 1 hora à temperatura ambiente. Mais uma vez, deitou-se fora o líquido e efectuou-se a lavagem das cavidades cerca de cinco vezes com PBST. A seguir, acrescentou-se cerca de 100 μL de substrato TMB (Sigma) a cada cavidade e interrompeu-se a reacção mediante a adição de 50 μL da solução de H_2SO_4 5N. Efectuou-se uma leitura do valor DO_{450} num espectrofotómetro (Molecular Devices).

B. Sequenciação dos clones de fagos

Para cada clone de fagos, preparou-se uma matriz de sequenciação, recorrendo a PCR. Foram utilizados os pares de oligonucleótidos a seguir indicados para amplificar um fragmento contendo aproximadamente 500 nucleótidos:

Iniciador 1: 5'-CGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTG-3' (SEQ ID NO: 54)

Iniciador 2: 5'-CATGTACCGTAACACTGAGTTTCGTC-3' (SEQ ID NO: 55)

Para cada clone preparou-se a mistura seguinte:

Reagentes	Volume (μL)/Tubo
dH_2O	26,25
glicerol a 50%	10
tampão PCR 10X (w/o MgCl_2)	5
MgCl_2 25 mM	4
mix dNTP 10 mM	1
iniciador 1 100 μM	0,25
iniciador 2 100 μM	0,25
polimerase de Tq	0,25

fagos em TE (secção 4)	3
volume de reacção final	50

Para a PCR, utilizou-se um amplificador automático de ADN (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems), a executar o seguinte programa: 94°C durante 5 minutos; (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos) x 30 ciclos; 72°C durante 7 minutos; arrefecimento para 4°C. O produto de PCR de cada reacção foi purificado, utilizando 'QIAquick Multiwell PCR Purification kit' (Qiagen), em conformidade com o protocolo do fabricante. O produto de PCR purificado foi depois analisado, experimentando cerca de 10 µL de cada mistura de reacção de PCR com cerca de 1 µL de corante (corante de carga de gel de agarose 10 X BBXS) sobre um gel de agarose a 1%. O produto restante foi depois sequenciado, utilizando o sequenciador ABI 377 (Perkin Elmer), em conformidade com o protocolo recomendado pelo fabricante.

6. Ordenamento sequencial e determinação de sequência de consenso

A. Ordenamento e análise de sequências

As sequências peptídicas que foram traduzidas a partir das sequências nucleotídicas variáveis (secção 5B) foram correlacionadas com os dados do protocolo 'ELISA'. Aos clones que revelaram um valor elevado de DO₄₅₀ nas cavidades recobertas com Ang-2 e um valor pequeno de DO₄₅₀ nas cavidades recobertas com estreptavidina foi-lhes atribuída uma classificação de prioridade mais elevada. Às sequências que ocorreram várias vezes foi-lhes atribuída também uma

classificação de alta prioridade. As sequências elegíveis foram escolhidas com base nestes critérios para análise posterior como péptidos ou peptícorpos.

B. Determinação da sequência de consenso

As diferentes classes de motivos de consenso foram geradas a partir da biblioteca TN8-1X, do modo seguinte:

KRPCEEXWGGCXYX (SEQ ID NO:56)

KRPCEEXFGGCXYX (SEQ ID NO:57)

XXXCXDXYWYCXXX (SEQ ID NO:61)

XXXCXDXYTYCXXX (SEQ ID NO:62)

XXXCXDXFWYCXXX (SEQ ID NO:63)

XXXCXDXFTYCXXX (SEQ ID NO:64)

XXXCXWDPWTCEXM (SEQ ID NO:58)

Foi gerado um motivo de consenso a partir da biblioteca TN12-I:

WSXCAWFXGXXXXXCRRX (SEQ ID NO:59)

Para a totalidade dos motivos de consenso, as "sequências de aminoácidos core" sublinhados de cada sequência de consenso foram obtidas determinando qual o aminoácido que ocorria mais frequentemente em cada posição. O símbolo "X" designa qualquer aminoácido que ocorra naturalmente. As duas cisteínas adjacentes às sequências core eram aminoácidos fixos nas bibliotecas TN8-IX e TN12-I.

Os péptidos identificados pela ligação a Ang-2 estão explicitados no quadro 3 subsequente.

Quadro 3: péptidos de ligação de Ang-2

Péptido	Seq Id No.	Sequência
TN8-8	1	KRPCEEMWGGCNYD
TN8-14	2	HQICKWDPWTCKHW
TN8-Con1	3	KRPCEEIFGGCTYQ
TN8-Con4	4	QEECEWDPWTCEHM
TN12-9	5	FDYCEGVEDPFTFGCDNH
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ
C17	7	QYGCDGFLYGCMIN

Exemplo 4Construção do ADN que codifica os peptícorpos

Os péptidos modificados, seleccionados como potencialmente inibidores da ligação Ang-2:Tie-2 (ver quadro 3), foram utilizados para construir proteínas de fusão em, que quer um monómero de cada péptido quer um dímero em tandem de cada péptido (com um *linker* entre as unidades monoméricas) foi fundido *in frame* com ADN que codifica um *linker* seguido por uma região Fc da IgG1 humana. Cada péptido modificado foi construído fazendo a recombinação de pares de oligonucleótidos ("oligos") para gerar um polinucleótido duplo que codifica o péptido conjuntamente com um *linker* constituído, dependendo isso do péptido, quer por cinco resíduos glicina, ou oito resíduos glicina ou um resíduo lisina; estas construções foram geradas como fragmentos de *NdeI* e de *XhoI*. Estas moléculas de polinucleótidos duplos foram ligadas ao vector (terminal

N de pAMG21-Fc, descrito mais adiante) que continha o gene de Fc humano, que havia sido previamente digerido com *NdeI* e *XhoI*. As misturas de ligação resultantes foram transformadas por electroporação efectuada em células da estirpe 2596 de *E. coli* (GM221, conforme descrito mais adiante), utilizando procedimentos convencionais. Efectuou-se uma pesquisa dos clones para investigar a sua aptidão para produzirem o produto de proteína recombinante e se possuíam a fusão de genes com uma sequência de nucleótidos correcta. Seleccionou-se um único destes clones para cada um dos péptidos modificados (isto é, produtos de fusão Fc-péptido).

Construção do vector do terminal N pAMG21-Fc.

pAMG21

O plasmídeo de expressão pAMG21 (ATCC No. 98113) é obtido a partir do vector de expressão pCFM1656 (ATCC No. 69576) e do sistema de vectores de expressão descrito na patente de invenção norte-americana nº 4 710 473, executando o processo descrito no pedido de patente de invenção internacional publicado com o nº WO 00/24782 (ver a parte do exemplo 2 ali descrito, entre as páginas 100-103, e também as figuras 17A e 17B).

Vector Fc do terminal N

O vector Fc do terminal N foi criado utilizando como matriz o monómero pAMG21 Tpo_Gly5_Fc da estirpe 3788 de *E. coli*. É possível encontrar informação sobre a clonagem desta estirpe no documento WO 00/24782 (ver o exemplo 2 e a figura 10 desse documento). Foi concebido um iniciador de

5' para a PCR (adiante melhor descrito) para remover a sequência peptídica de Tpo em "pAMG Tpo_Gly5" e para a substituir por um polilinker contendo os locais ApaLI e XhoI. Utilizando como matriz a estirpe 3788, executou-se a PCR com "Expand Long Polymerase", utilizando o oligonucleótido de SEQ ID NO: 8, adiante representada, como iniciador de 5', e um iniciador de 3' universal, SEQ ID NO: 9, adiante representada. O produto de PCR resultante foi purificado em gel e digerido com as enzimas de restrição NdeI e BsrGI. Tanto o plasmídeo como o polinucleótido que codifica o péptido relevante, conjuntamente com o seu linker, foram purificados em gel, utilizando colunas centrífugas de purificação em gel da "Qiagen" (Chatsworth, CA). O plasmídeo e o produto de inserção foram depois ligados, utilizando procedimentos convencionais de ligação, tendo a mistura de ligação resultante sido transformada utilizando células de *E. coli* (estirpe 2596). Foram seleccionados clones singulares e efectuou-se a sequenciação do ADN. Foi identificado um clone correcto que foi utilizado como fonte vectorial para os péptidos modificados aqui descritos.

Iniciador de 5':

**ACAAACAAACATATGGGTGCACAGAAAGCGGCCGCAAAAAAA
CTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACA (SEQ ID NO: 8)**

Iniciador de 3':

GGTCATTACTGGACCGGATC (SEQ ID NO: 9)

Para além de se fazer estes péptidos modificados como produtos de fusão com Fc no terminal N (pepticorpos do

terminal N), alguns deles também foram produzidos como produtos de fusão do terminal C (peptícorpos do terminal C). O vector utilizado para se fazer os produtos de fusão do terminal C está descrito adiante.

Construção do vector Fc do terminal C

O vector Fc do terminal C para péptidos modificados foi criado utilizando como matriz um monómero pAMG21 Fc_Gly5_Tpo da estirpe 3728 de *E. coli*. A informação sobre a clonagem desta estirpe pode ser encontrada no documento WO 00/24782 (ver o exemplo 2 e a figura 7 ali contidos). Concebeu-se um iniciador de 3' para a PCR (SEQ ID NO: 10) para remover a sequência peptídica de Tpo e para a substituir por um polilinker contendo os locais ApaLI e XhoI. Utilizando a estirpe 3728 como matriz, realizou-se a PCR com "Expand Long Polymerase", utilizando um iniciador de 5' universal (SEQ ID NO: 11) e o iniciador de 3' mencionado antes. O produto resultante da PCR foi purificado em gel e digerido com as enzimas de restrição BsrGI e BamHI. Tanto o plasmídeo como o polinucleótido que codifica cada um dos péptidos relevantes com o seu linker foram purificados em gel recorrendo a colunas centrífugas de purificação em gel 'Qiagen'. O plasmídeo e o produto de inserção foram depois ligados, utilizando procedimentos convencionais de ligação e a mistura de ligação resultante foi transformada recorrendo a células de *E. coli* (estirpe 2596). Foram seleccionados clones singulares e efectuou-se a sequenciação do ADN. Foi identificado um clone correcto que foi utilizado como fonte vectorial para os péptidos modificados aqui descritos.

Iniciador de 5' :

CGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGG (SEQ ID NO: 10)

Iniciador de 3' :

**TTTGTTGGATCCATTACTCGAGTTTTTTTGC GGCCGCTTTCTGTG
CACCACCACCTCCACCTTTAC (SEQ ID NO: 11)**

GM221 (n° 2596). A estirpe n° 2596, aqui utilizada para a expressão das proteínas de fusão Fc-péptido, é uma estirpe K-12 de *E. coli* modificada para conter o promotor *lux* e simultaneamente o repressor λ cI857s7 sensível à temperatura e a região *ebg* cuja expressão ocorre mais cedo e o repressor *lacI*⁰ da região *ebg* cuja expressão ocorre depois. A presença destes dois genes repressores permite a utilização deste hospedeiro com uma variedade de sistemas de expressão. A designação da ATCC para esta estirpe é 202174.

Exemplo 5

Produção de peptidocorpos

Expressão em *E. coli*. As culturas de cada um dos arquétipos de fusão pAMG21-Fc em *E. coli* GM221 foram desenvolvidas a 37°C em meio constituído por 'Caldo Terrífico' (ver Tartof e Hobbs, "Improved media for growing plasmid and cosmid clones", Bethesda Research Labs Focus, Volume 9, página 12, 1987, conforme citado na obra já referida de Sambrook *et al.*). A indução da expressão do produto génico a partir do promotor *luxPR* foi conseguida mediante a adição do autoindutor sintético, N-(3-oxo-

hexanoíl)-DL-homosserina-lactona, ao meio de cultura até uma concentração final de 20 ng/mL. As culturas ficaram a incubar a 37°C durante mais 6 horas. Depois efectuou-se o exame das culturas bacterianas por microscopia para pesquisar a presença de corpos de inclusão e fez-se a colheita por centrifugação. Foram observados corpos de inclusão refractivos em culturas induzidas, indicando que as fusões com Fc eram produzidas muito provavelmente na fracção insolúvel em *E. coli*. Efectuou-se a citólise dos aglomerados celulares, directamente por reconstituição da suspensão em tampão de amostragem Laemmli contendo 10% de β -mercaptoetanol e depois fez-se a análise por SDS-PAGE. Na maior parte dos casos, observou-se sobre um gel de SDS-PAGE uma banda intensa contrastada com o corante de Coomassie com o peso molecular adequado.

Purificação. Efectuou-se o desmembramento das células em água (1/10) recorrendo a um processo de homogeneização a alta pressão (duas passagens a 14000 psi), tendo os corpos de inclusão sido recolhidos por centrifugação (4000 r.p.m. numa centrifugadora J-6B, durante 1 hora). Os corpos de inclusão foram solubilizados em guanidina 6M, Tris 50 mM, DTT 10 mM a pH 8,5 durante 1 hora à razão de 1/10. Para os péptidos lineares fundidos com Fc, a mistura solubilizada foi diluída 25 vezes em ureia 2M, Tris 50 mM, arginina 160 mM, cisteína 2 mM a pH 8,5. Deixou-se decorrer a oxidação durante 2 dias a 4°C para permitir a formação do composto ligado por pontes dissulfureto (isto é, homodímero Fc-péptido). Para os péptidos cíclicos fundidos com Fc repetiu-se este mesmo protocolo com a inclusão das três condições de desdobramento seguintes: (1) ureia 2M, Tris 50 mM, arginina 160 mM, cisteína 4 mM, cistamina 1mM a pH

8,5; (2) ureia 4M, glicerol a 20%, Tris 50 mM, arginina 160 mM, cisteína 2 mM a pH 8,5; (3) ureia 4M, glicerol a 20%, Tris 50 mM, arginina 160 mM, cisteína 4 mM, cistamina 1 mM a pH 8,5. Submeteu-se a proteína desdobrada a diálise em presença de ureia 1,5 M, NaCl 50 mM, Tris 50 mM, pH 9,0. Reduziu-se o valor do pH desta mistura para pH 5 com ácido acético. Removeu-se o precipitado por centrifugação, ajustou-se o valor do pH do sobrenadante para 5 a 6,5, dependendo disso do ponto isoeléctrico de cada produto de fusão. Filtrou-se a proteína e carregou-se a 4°C numa coluna de 'SP-Sepharose HP' equilibrada em NaAc 20 mM e NaCl 50 mM para cada valor de pH determinado para cada arquétipo. Efectuou-se a eluição da proteína utilizando um gradiente linear até 20 vezes o volume da coluna com o mesmo tampão a variar entre NaCl 50 mM e NaCl 500 mM. Juntou-se e filtrou-se a fracção do pico. Os peptícorpos gerados utilizando os procedimentos supramencionados estão explicitados no quadro 4 subsequente.

Quadro 4

Peptícorpo	Sequência dos Peptícorpos
L1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 12)
L1 (N)	WT MKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 13)
L1 (N) 1K WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGS GSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:14)
2xL1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGKFNPL DELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:15)
2xL1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGKFNPLDELEE TLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:16)

Con4 (N)	MGAQQEECEWDPWTCEH1VVIZ.EGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 17)
Con4 (N) 1K-WT	MQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:18)
2xCon4 (N) 1K	MGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:19)
L1 (C)	M-Fc-GGGGGAQKFNP LDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO: 20)
L1 (C) 1K	M-Fc-GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:21)

(continuação)

Pepticorpo	Sequência dos Peptícorpos
2xL1 (C)	M-Fc-GGGGGAQKFNP LDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:22)
Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:23)
Con4 (C) 1K	M-Fc-GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:24)
2xCon4 (C) 1K	M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:25)
Con4-L1 (N)	MGAQEECEWDPWTCEHMGGGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:26)
Con4-L1 (C)	M-Fc-GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:27)
TN-12-9 (N)	MGAQ-FDYCEGVDPFTFGCDNHLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO: 28)

C 17 (N)	MGAQ-QYGCDGFLYGCMINLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO: 29)
TN8-8 (N)	MGAQ-KRPCEEMWGGCNYDLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:30)
TN8-14 (N)	MGAQ-HQICKWDPWTCKHWLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:31)
Con1 (N)	MGAQ-KRPCEEIFGGCTYQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:32)

No quadro 4, "Fc" refere-se à sequência de IgG1 da Fc humana. A coluna 2 indica a sequência de aminoácidos do peptícorpo. Deste modo, a parcela Fc está identificada por "Fc" e corresponde ao explicitado na SEQ ID NO: 60 subsequente. Faz-se observar que no caso de se utilizar um identificador, por exemplo, "Con4" ou "Con-4", este refere-se ao péptido Con-4, ao passo que os sufixos "C", "(C)", ou "-C"; ou "N", "(N)" ou "-N" aí assinalados indicam que a molécula é um peptícorpo, conforme aqui descrito. Os sufixos "N", "(N)" ou "-N" no nome de um peptícorpo indicam que o péptido (ou péptidos) de ligação de Ang-2 está/estão no terminal N do domínio Fc e os sufixos "C", "(C)" ou "-C" indicam que o péptido (ou péptidos) de ligação de Ang-2 está/estão no terminal C do domínio Fc. Além disso, o termo 2xCon4 (C) 1K, conforme definido na SEQ ID NO: 25, também pode ser considerado sem o sufixo "1K" aqui indicado.

A sequência de aminoácidos da parcela Fc de cada peptícorpo é a que a seguir se indica (partindo o terminal amino para o terminal carboxilo):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK (SEQ ID NO: 60)

As sequências de ADN (SEQ ID Nos: 33-53) que codificam os peptícorpos correspondentes respectivamente ao peptícorpo das SEQ ID NOs: 12-32 no quadro 4, são as explicitadas adiante:

SEQ ID NO: 33

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCT
 GTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGG
 ACAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
 GACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCCTCAAGGACACCCTCATGAT
 CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
 CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC
 GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
 GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
 CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
 GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
 TCCGGGTAAATAATGGATCC

SEQ ID NO:34

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
GTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCA
CACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT
TTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATAA

SEQ ID NO:35

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
GTTCACTTTCCAGCAGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCC
ACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGC
GGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTC
CTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA
CCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT
CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA
CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:36

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCT
 GTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGG
 TAAGTTCAACCCACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTT
 CACTTTCCAGCAACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACA
 CATGTCCACCTTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTT
 TCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
 CTGAGGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
 ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
 CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
 CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
 CCCCATCCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCC
 TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
 TAA

SEQ ID NO:37

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
 GTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCC
 ACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTTCCAGCA
 ACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTT
 GCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCC
 AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG
 CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
 GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
 AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
 TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
 AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCGG
 ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
 TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
 GAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCC
 TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
 GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
 TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:38

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCCAATGGGACCCATGGACTTGCGA
 ACACATGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC
 CACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTT
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCTGACACCAGGACTGGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
 CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:39

ATGCAGGAAGAATGCCAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGGG
 ATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCA
 GGCAGTGCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCA
 CACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT
 TTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
 CTTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
 GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
 GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
 TCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
 CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC
 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
 AATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGA
 CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
 CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
 TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
 ATAA

SEQ ID NO:40

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGA
 ACACATGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAG
 CTCTGGTTCAGGCAGTGGGACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCC
 ATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGGGTGGAGGCCGTGGGGACAAAA
 CTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
 CAGTTTTCTCTTCCCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
 GACCCCTGAGGTACATGCCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
 CTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
 CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCACTACAACAGCACCTACCGTGTG
 GTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
 TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCAAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
 CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCTGAC
 CTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
 GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA
 AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
 AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAATAA

SEQ ID NO:41

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
 GCTGGACGAGCTGGAAGAGACTCTGTACGAACAGTTTACTTTTCAACA
 GCTCGAGTAA

SEQ ID NO:42

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
GACTCATAAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGA
ACAGTTCACTTTCCAGCAACTCGAGTAA

SEQ ID NO:43

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
GCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAAACAGTTCACTTTCCAGCA
GGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCCACTGGATGAGCT
GGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTTCCAGCAACTCGAGTAA

SEQ ID NO:44

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
 GCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGTAA

SEQ ID NO:45

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
 TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
 GACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACA
 TGCTCGAGTAA

SEQ ID NO:46

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCFTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
 GCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGGGATCCGGTTCTGCTA
 CTGGTGGTTCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGCGCGACTC
 ATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTC
 GAGTAA

SEQ ID NO:47

ATGGGTGCACAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACA
 CATGGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAATTCAACCCGCTGGACGA
 ACTGGAAGAACTCTGTACGAACAGTTCACCTTCCAGCAGGGATCCGG
 TTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGTTTCAGGCAGT
 GCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGACAAAACCTCACACATGT
 CCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCT
 TCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
 TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
 TCAACTGGTACGTGGACGGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:48

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCCAQCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTTCCTCTTCCCCCCTAAAACCCAAGGACACCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
 TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
 GACTCATAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCTGTACGA
 ACAGTTCACTTTCAGCAGGGTGGTGGCGGTGGTCAGGAAGAATGCCA
 ATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGTAA

SEQ ID NO:49

ATGGGTGCACAGTTCGACTACTGCGAAGGTGTTGAAGACCCGTTCACT
 TTCGGTTGCGACAACCACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAAC
 TCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
 AGTTTTCCTCTTCCCCCCTAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
 ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
 CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
 CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
 CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
 TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCT
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGICTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
 GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
 AAATAA

SEQ ID NO:50

ATGGGTGCACAGCAGTACGGTTGCCGACGGTTTTCTGTACGGTTGCATG
 ATCAACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCC
 ACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTC
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
 ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
 GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
 CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
 GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
 CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
 AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGAATCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:51

ATGGGTGCACAGAAACGCCCATGCCAAGAAATGTGGGGTGGTTGCAA
 CTACGACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC
 CACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTC
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTT
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGAATCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:52

ATGGGTGCACAGCACCAGATCTGCAAATGGGACCCGTGGACCTGCAA
 AACTGGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACACACATGTC
 CACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTT
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
 CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAAGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:53

ATGGGTGCACAGAAACGTCCATGCCAAGAAATCTTCGGTGGTGCACC
 TACCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACACACATGTCC
 ACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTC
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
 GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
 CCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
 GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
 CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGCCTTCTATCCCAAGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
 AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

Exemplo 6Ensaio de Peptícorpos

Foram testados 14 dos peptícorpos utilizando o protocolo ELISA de neutralização e foram testados 3 dos

peptícorpos utilizando o protocolo ELISA de afinidade. Os resultados estão agrupados no quadro 5.

Quadro 5

	hAng-2		mAng-2		hAng-1	
Peptícorpo	CI ₅₀ (nM)	CE ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CE ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CE ₅₀ (nM)
2xCon4 (C) 1K	0,04		0,02			
Con4-L1 (C)	0,05		0,04			
Con4 (C)	0,20		0,30			
2xL1 (N)	0,65		0,80			
Con4 (N)	0,85	0,03	0,72	0,07	Sem inibição	Sem ligação
2xL (C)	0,90		1,0			
Con4 (N) 1K-WT			1,9			
L1 (N)	6		11		Sem inibição	

(continuação)

	hAng-2		mAng-2		hAng-1	
Peptícorpo	CI ₅₀ (nM)	CE ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CE ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CE ₅₀ (nM)
C17 (N)	9		13		Sem inibição	
12-9 (N)	21		7,7		Sem inibição	
Con1 (N)	26		-200		Sem inibição	
8-14 (N)	45		33		Sem inibição	
L1 (C)	65		37			
8-8 (N)	80		-700		Sem inibição	
Controlo negativo Peptícorpo 4883	Sem inibição	Sem ligação	Sem inibição	Sem ligação	Sem inibição	Sem ligação

A sequência de aminoácidos do peptícorpo 4883 de controlo negativo é a que a seguir se indica (a parcela Fc está sublinhada, o *linker* "GGGGG" e a parcela peptídica estão a negrito):

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGN VFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLS
PGK-GGGGG-CTAGYHWNSDCECCRRN (SEQ ID NO: 243)

Faz-se observar que a utilização do termo "sem inibição" no texto presente não pretende indicar que os compostos não tenham nenhuma qualidade inibidora. Em vez disso, o termo "sem inibição", tal como aqui utilizado, refere-se aos compostos que ao serem testados utilizando o protocolo de ensaio ELISA de neutralização, nas condições aqui descritas, revelaram um valor CI_{50} superior a 1000 nM, que foi a concentração mais elevada a que estes compostos foram pesquisados. Embora não tenham sido observadas qualidades inibidoras significativas para as moléculas classificadas com o termo "sem inibição", faz-se observar que tais moléculas podem demonstrar realmente qualidades inibidoras em condições de ensaio diferentes, ou em ensaios diferentes. De acordo com uma variante preferencial, faz-se observar que a invenção diz respeito aos peptícorpos que possuem qualidades inibidoras quando são utilizados os ensaios aqui descritos.

Foram testados dois dos peptícorpos utilizando o ensaio BIAcore de afinidade (conforme descrito no exemplo 2). Os resultados estão agrupados no quadro 6 subsequente.

Quadro 6

<u>Afinidades do peptidocorpo (Pc) para h-Ang-2 e mAng-2</u>						
	hAng-2				mAng-2	
Peptidocorpo	K _D (nM)	k _a (1/Ms)	k _d (1/S)	K _D (nM)	k _a (1/Ms)	k _d (1/S)
Pc L1 (N)	3,1	2,9 x 10 ⁵	9,1 x 10 ⁻⁴	0,42	5,6 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁻⁴
Cons4 (N)	0,67	3,3 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁻⁴	0,60	7,3 x 10 ⁵	4,4 x 10 ⁻⁴
TN 12-9 (N)	8,2	1,2 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁻³	0,32	7,2 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁻⁴

Exemplo 7Estudos de eficácia terapêutica com o peptidocorpo de Ang-2 administrado por via sistêmica

Administrou-se o peptidocorpo de Ang-2, TN8-Con4-C, subcutaneamente a murganhos portadores do tumor A431, à razão de uma vez por dia ao fim de 72 horas após o estímulo tumoral. As doses de peptidocorpo utilizadas foram 1000, 200, 40 e 8 µg/murganho/dia. Administrou-se a todos os animais um total de 20 doses. Efectuou-se o registo das massa e dos volumes tumorais três vezes/semana. No final do estudo os animais foram sacrificados e efectuou-se a recolha dos seus soros para medição das concentrações de peptidocorpo, pelo protocolo ELISA. Recolheu-se de todos os grupos tecidos tumorais e um painel de tecidos normais.

Os resultados estão ilustrados na figura 1. Conforme se pode ver, foram observadas diferenças significativas no crescimento tumoral entre os grupos tratados com o peptidocorpo de Ang-2 e o grupo de controlo tratado com veículo. Todas as quatro doses de peptidocorpo de Ang-2 inibiram o crescimento tumoral, comparativamente com os controlos de veículo ($p < 0,0001$ vs. controlo de veículo, utilizando a metodologia de medição repetida ANOVA). Pelo contrário, os tumores do grupo de controlo continuaram a

crescer a uma velocidade muito maior. O tratamento com este pepticorpo não teve nenhum efeito significativo sobre as massas corporais finais, sobre as massas dos órgãos ou sobre os parâmetros hematológicos dos animais tratados com as doses supramencionadas.

Exemplo 8

1. Construção de bibliotecas de péptidos secundários de Ang-2

A. Células de *E. coli* electrocompetentes

As células competentes para electroporação 'Epicurian Coli® XL1-Blue MRF' (Stratagene #200158) foram adquiridas a Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA).

B. Modificação do vector pCES1

Realizou-se a PCR utilizando os sistemas de PCR "Extend Long Template (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) com 1 µg de vector pCES1 (TargetQuest Inc.), enquanto matriz. O volume da mistura de PCR foi de 100 µL contendo tampão 1x PCR, 200 nM de cada um dos dois iniciadores: 5'-CAAACGAATGGATCCTCATTAAGCCAGA-3' (SEQ ID NO: 244) e 5'-GGTGGTGCGGCCGCACTCGAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCA-3' (SEQ ID NO: 245), 200 nM de dNTP e 3 unidades (U) de polimerase de ADN de Taq. O sistema de PCR "TRIO-Thermoblock" (Biometra) decorreu do modo seguinte: 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos e 72°C durante 10 minutos; arrefecimento para 4°C.

Os produtos de PCR foram depois processados num gel de agarose a 1% e purificados numa coluna centrífuga 'QIAGEN' (QIAGEN Inc., Valencia, CA), em conformidade com o protocolo do fabricante. Efectuou-se uma segunda reacção de PCR com 5 µL de produtos de PCR e 200 nM de cada um dos dois iniciadores 5'-CAAACGAATGGATCCTCATTAAGCCAGA-3' (SEQ ID NO:246) e 5'-AACACAAAAGTGACAGGGTGGAGGTGGTGGTGC GGCCGCACT-3' (SEQ ID NO: 247) nas mesmas condições de PCR descritas anteriormente.

Os produtos de PCR e o vector original pCES1 foram depois digeridos separadamente com 100 µL de tampão de reacção contendo 1x NEB2, 60 U de ApaLI (New England Biolabs, Beverly, MA), 60 U de BamHI (New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora. O ADN digerido foi depois purificado recorrendo a uma coluna centrífuga 'QIAGEN' e novamente ligado em 40 µL de uma mistura de reacção contendo tampão de ligação 1x e 40 U de ligase de ADN de T4 (New England Biolabs) à temperatura ambiente, de um dia para o outro.

Os vectores foram transfectadas em *E. coli* e ficou tudo a incubar a 37°C de um dia para o outro. Efectuou-se a selecção de colónias singulares isoladas e depois fez-se a purificação dos plasmídeos, utilizando uma coluna centrífuga 'QIAGEN'. A inserção correcta foi confirmada por sequenciação do ADN.

C. Preparação do ADN vectorial

Transformou-se 1 µg de ADN do vector pCES1 (obtido na secção 1B anterior) utilizando para tal 40 µL de células XL1-blue electrocompetentes de *E.coli* (da secção 1A anterior) recorrendo ao aparelho 'Gene Pulser II' (BIO-RAD, Hercules, CA) regulado para 2500 V, 25 µF e 200 ohms. A

amostra de bactérias transformadas foi transferida imediatamente para um tubo de ensaio contendo 960 µL de SOC (2% de triptona, 0,5% de extracto de levedura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, glicose 20 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10mM) e deixou-se a cultura em crescimento a 37°C com agitação durante 1 hora.

As células foram depois espalhadas sobre a placa de ágar 2xYTAGT (2xYT contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL, tetraciclina na concentração de 12,5 µg/mL e 2% de glicose) e manteve-se tudo a incubar a 37°C de um dia para o outro. Foi confirmada uma colónia única por sequenciação, tendo sido utilizada para inocular 2 litros de meios 2xYTAGT a 37°C com agitação de um dia para o outro. O ADN do vector plasmídico foi purificado com o estojo 'QIAGEN Plasmid Maxi', em conformidade com o protocolo do fabricante.

D. Digestão do ADN do vector

Utilizou-se um total de cerca de 2000 µg de ADN do vector (da secção 1C anterior) cuja digestão foi feita em 500 µL de meio reaccional contendo 1x NEB de tampão 2, 300 U de ApaLI e 300 U de XhoI a 37°C de um dia para o outro. O produto da reacção da digestão de restrição ficou a incubar de um dia para o outro a 37°C e depois foi analisado num gel de agarose a 0,8% prefabricado (Embi Tec, San Diego, CA). O ADN do vector linearizado foi depois excisado do gel e extraído com o estojo de extracção de gel 'QIAquick' (QIAGEN Inc.) em conformidade com as instruções do fabricante.

E. Preparação de oligonucleótidos para produção de bibliotecas

Foram concebidos seis oligonucleótidos para produção de bibliotecas (1 fixado e 5 "doped", isto é, a síntese foi realizada usando uma quantidade desigual dos quatro nucleótidos) com base nas sequências provenientes dos resultados descritos *supra*. O oligonucleótido fixo para produção de bibliotecas:

**5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKS
ARTGGGATCCGTGGASCNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNCATT
CTCTCGAGATCA-3'** (número de banco 20) (SEQ ID NO: 248);

e dois dos oligonucleótidos "doped" a 70% para produção de bibliotecas:

**5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKaaKcgKccKNNKga
KgaKatKttKggKggKNNKacKtaKcaKNNKNNKNNKNCATTCTC
TCGAGATCA-3'** (número de banco 27); (SEQ ID NO: 249);

**5'-CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKga
KacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKNCATTCTCTCGAGATCA-
3'** (número de banco 99); (SEQ ID NO: 250);

As letras minúsculas representam uma mistura de 70% da base indicada e 10% de cada um dos outros três nucleótidos). Os outros três dos oligonucleótidos "doped" a 91% para produção de bibliotecas foram os seguintes:

**5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKcaKgaKgaKTGCgaKtg
KgaKccKtgKacKTGCgaKcaKatKNNKNNKNNKNCATTCTCTCGAGA
TC A-3'** (número de banco 94); (SEQ ID NO: 251);

**5'-CACAGTGCACAGGGTNNKttKgaKtaKNNKgaKggKgtKgaKgaKcc
KttKacKttKggKNNKgaKaaKcaKNNKCATTCTCTCGAGATCA-3'**

(número de banco 25); (SEQ ID NO: 252);

e

**5'-CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKga
KacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKCATTCTCTCGAGATCA-
3'** (número de banco 26); (SEQ ID NO: 253);

Faz-se observar aos especialistas na matéria que no caso dos oligonucleótidos anteriores o símbolo "N" indica que cada um dos quatros nucleótidos (A, T, C e G) está igualmente representado durante a síntese dos oligonucleótidos e o símbolo "K" indica que os nucleótidos G e T estavam igualmente representados durante a síntese dos oligonucleótidos. As letras minúsculas representam uma mistura de 91% da base indicada e 3% de cada um dos outros três nucleótidos. Cada um destes oligonucleótidos foi utilizado como matriz na PCR.

Utilizou-se o estojo "Expand High Fidelity PCR System" (Roche Diagnostics Corp.) para as reacções de PCR. Cada oligonucleótido para produção de bibliotecas foi amplificado numa placa de 96 cavidades, contendo cada uma delas 50 µL de mistura de reacção de PCR com 1 nM de um oligonucleótido de biblioteca, tampão 1X PCR e 300 nM de cada um dos iniciadores:

5'-CACAGTGCACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 254);

e

5'-TGATCTCGAGAGAATG-3', (SEQ ID NO: 255);

dNTP 2001 μ M, $MgCl_2$ 1,5 mM e 350 U de polimerase 'Expand'. Utilizou-se o aparelho de amplificação automática de ADN (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems), executando o seguinte programa: 94°C durante 5 minutos; 25 ciclos de (94°C durante 30 segundos, 52,5°C durante 60 segundos, 72°C durante 30 segundos); 72°C durante 10 minutos; arrefecimento para 4°C. Os nucleótidos livres foram depois removidos utilizando para tal o estojo de purificação 'QIAquick PCR' (QIAGEN Inc., número de catálogo 28104) em conformidade com os protocolos do fabricante.

F. Digestão dos oligonucleótidos para produção de bibliotecas

Para cada biblioteca fez-se digerir os produtos de PCR (secção 1E) em 1200 μ L de uma mistura de reacção que continha 1x NEB tampão 2, 750 U de ApaLI e 750 U de XhoI a 37°C de um dia para o outro. Separou-se o ADN digerido, utilizando para tal um gel de agarose a 3% prefabricado (Embi Tec). A banda de ADN relevante, de cada reacção, foi cortada a partir do gel e extraída com um filtro de acetato de celulose de 0,22 μ m (Coming Inc., Cat# 8160) num tubo de ensaio de uma centrífugadora 'COSTAR Spin-X'.

G. Ligação do vector com oligonucleótidos para produção de bibliotecas

Os 450 μ L de mistura da reacção de ligação continham o vector linearizado (secção 1D) e cada um dos produtos de PCR do banco digeridos (secção 1F) na proporção molar de 1:5, 1x NEB de tampão de ligação e 20 000 U de ligase de ADN de T4, a 16°C de um dia para o outro. Os produtos ligados ficaram a incubar a 65°C durante 20 minutos para se

inactivar a ligase do ADN de T4 e depois a incubação prosseguiu com 100 U de NotI a 37°C durante 2 horas, para minimizar a autoligação do vector. Os produtos ligados foram depois purificados por meio de extracção convencional com fenol/clorofórmio (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al., 3ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000) e foram recolocados em suspensão em 120 µL de H₂O

H. Transformação por electroporação

Para cada biblioteca foram efectuadas 12 reacções de electroporação. Para cada transformação misturou-se 10 µL de ADN do vector ligado (secção 1G) e 300 µL de células XL1-BLUE MRF' (secção 1A) num cadinho de 0,2 cm (BIO-RAD). A mistura resultante foi estimulada com impulsos com o aparelho 'Gene Pulser II' regulado para 2500 V, 25 µF e 200 ohms. As bactérias transformadas das 12 reacções de electroporação foram depois combinadas e transferidas para um balão contendo 26 mL de SOC para incubação a 37°C durante 1 hora. As células foram depois introduzidas em 450 mL de 2xYTAG e ficaram a crescer a 37°C com agitação durante 5 horas. Efectuou-se a centrifugação das células a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Com as massas celulares obtidas preparou-se nova suspensão em 12 mL de uma mistura de 15% de glicerol/2xYT e guardou-se a -80°C. Isto constitui o primeiro lote de bibliotecas. As titulações revelaram bibliotecas com tamanhos de transformantes independentes de $5,0 \times 10^9$ (número da biblioteca 20), $3,3 \times 10^{10}$ (número da biblioteca 94), $4,7 \times 10^9$ (número da biblioteca 25), $5,0 \times 10^9$ (número da biblioteca

26), $3,0 \times 10^9$ (número da biblioteca 27) e $4,2 \times 10^9$ (número da biblioteca 99).

2. Amplificação das bibliotecas

A. Preparação do lote secundário das bibliotecas

A partir do lote de células da biblioteca primária (provenientes da secção 1H anterior), utilizou-se um número suficiente de células para cobrir com um excesso 10 vezes superior o tamanho de cada biblioteca, para inocular meios 2xYTAGT (2YT com ampicilina na concentração de 100 µg/mL tetraciclina na concentração de 12,5 µg/mL e 2% de glicose) de tal modo que o valor inicial de DO_{600} foi 0,1. Deixou-se as culturas crescerem a 37°C com agitação durante várias horas até se obter um valor $DO_{600}=0,5$. Retirou-se uma aliquota de um décimo de cada biblioteca e deixou-se crescer em balões separados durante mais outras 2 horas a 37°C. Estas sub-culturas foram depois centrifugadas a 4000 r.p.m., utilizando uma centrífugadora Beckman JA-14 durante 10 minutos a 4°C, e com a massa de bactérias preparou-se nova suspensão em 7,0 mL (para cada biblioteca) de uma mistura contendo 15% de glicerol/2xYT para armazenagem a - 80°C.

B. Indução de fagos

Foram acrescentadas aliquotas do fago auxiliar M13K07 (Amersham Pharmacia Biotech) às culturas bacterianas remanescentes, ao valor de $DO_{600} = 0,5$ (provenientes da secção 2A anterior), até à concentração final de 3×10^9 ufp/mL. Deixou-se o fago auxiliar infectar as bactérias a 37°C durante 30 minutos, sem agitação e 30 minutos com

agitação moderada. Efectuou-se a centrifugação das células infectadas a 5000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Com as massas de células preparou-se nova suspensão no mesmo volume (proveniente da secção 2A anterior), com os meios 2xYTAK (2YT com ampicilina na concentração de 100 µg/mL e canamicina na concentração de 40 µg/mL). Esperou-se que ocorresse a produção de fagomídeos a 30°C de um dia para o outro com agitação.

C. Colheita de fagos

Efectuou-se a centrifugação das culturas bacterianas da secção 2B anterior, a 5000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Depois transferiu-se os sobrenadantes para novos frascos e acrescentou-se uma quantidade igual a 0,2 volume de mistura de 20% de PEG/NaCl 2,5 M e manteve-se tudo a incubar sobre gelo durante 1 hora para precipitar os fagomídeos. Os fagomídeos precipitados foram centrifugados a 10 000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C e foram cuidadosamente recolocados em suspensão com 100 mL de PBS frio. A solução de fagomídeos foi ainda purificada por centrifugação para remoção das células remanescentes a 4000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, tendo a precipitação dos fagomídeos ocorrido por adição de uma quantidade igual a 0,2 volume de mistura de 20% de PEG/NaCl 2,5 M. Os fagomídeos foram centrifugados a 10000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C e com a massa de fagomídeos preparou-se nova suspensão com 18 mL de PBS frio. Acrescentou-se à solução de fagomídeos 6 mL de uma solução de glicerol a 60% para armazenagem a -80°C. As titulações dos fagomídeos foram determinadas por meio de um procedimento convencional (Molecular Cloning, Maniatis et al 3ª Edição).

3. Selecção do fago de ligação de Ang-2

A. Imobilização de Ang-2 sobre esférulas magnéticas

A Ang-2 biotinilada (proveniente da secção 3A anterior) foi imobilizada sobre 'Dynabead M-280 Streptavidin (DYNAL, Lake Success, NY) com uma concentração de 2000 ng de proteína Ang-2 por cada 100 µL do lote de esférulas adquirido ao fabricante. Depois de se ter deslocado as esférulas para um lado de um tubo de ensaio, utilizando um íman, e removendo o líquido por meio de uma pipeta, efectuou-se a lavagem das esférulas duas vezes com soluto salino tamponado com fosfato (PBS) e preparou-se nova suspensão em PBS. A proteína Ang-2 biotinilada foi depois acrescentada às esférulas lavadas, ao valor da concentração anterior, e manteve-se tudo a incubar com rotação durante 1 hora à temperatura ambiente. As esférulas recobertas com Ang-2 foram então bloqueadas mediante a adição de BSA até à concentração final de 2% e manteve-se tudo a incubar de um dia para o outro a 4°C com rotação. As esférulas resultantes recobertas com Ang-2 foram depois lavadas duas vezes com PBST (PBS contendo 0,05% de Tween-20) antes de terem sido submetidas a procedimentos de selecção.

B. Selecção utilizando as esférulas recobertas com Ang-2

Foram utilizados fagomídeos equivalentes a cerca de 1000 vezes a biblioteca (da secção 2C anterior) que foram bloqueados durante 1 hora com 1 mL de PBS contendo 2% de BSA. A amostra de fagomídeos bloqueada foi submetida a três passos de selecção negativa, acrescentando-a às esférulas

virgens (as mesmas esférulas da secção 3A, mas sem nenhum revestimento de proteína Ang-2) e manteve-se esta mistura a incubar à temperatura ambiente durante 15 minutos com rotação. O sobrenadante que continha os fagomídeos foi deslocado, utilizando um íman, e transferido para um segundo tubo de ensaio contendo esférulas virgens (as mesmas esférulas descritas na secção 3A anterior, mas sem estarem cobertas com a proteína Ang-2) e depois manteve-se esta mistura a incubar à temperatura ambiente durante 15 minutos com rotação.

Repetiu-se o procedimento. O sobrenadante que continha os fagomídeos foi depois deslocado, utilizando um íman, e transferido para um novo tubo de ensaio contendo as esférulas recobertas com a proteína Ang-2 (da secção 3A) e manteve-se a mistura a incubar à temperatura ambiente durante 1 hora com rotação. Depois de se ter deitado fora o sobrenadante, as esférulas a que estavam ligados os fagomídeos foram lavadas 10 vezes com uma mistura de 2% de leite-PBS; 10 vezes com uma mistura de 2% de BSA-PBS; 10 vezes com PBST e duas vezes com PBS. Depois esperou-se que tivesse lugar a eluição dos fagomídeos em 1 mL de uma solução de trietilamina 100 mM (Sigma, St. Louis, MO) durante 10 minutos, numa centrífugadora. Neutralizou-se o pH da solução que continha os fagomídeos, adicionando 0,5 mL de Tris-HCl 1 M (pH 7,5). Os fagomídeos resultantes foram utilizados para infectar 10 mL de bactérias XL1-Blue MRF' de desenvolvimento recente (DO_{600} aproximadamente igual a 0,5) a 37°C durante 30 minutos sem agitação, e durante 30 minutos com agitação moderada. Todas as células XL1-BLUE MRF' foram depois aplicadas sobre uma placa de 15X15cm

2xYTAG e manteve-se tudo a incubar a 30°C de um dia para o outro.

C. Indução e colheita de fagos

Acrescentou-se à placa (da secção 3B) uma aliquota de 10 mL de meios 2xYTAGT, para recolocar as células XL1-BLUE MRF' em suspensão. Todas as células XL1-BLUE MRF' foram recolhidas num tubo de ensaio e acrescentou-se uma aliquota de 200 µL destas células a 25 mL de meio 2xYTAGT, tendo ficado a crescer a 37°C até se obter um valor $DO_{600} = 0,5$. Acrescentou-se o fago auxiliar M13K07 até à concentração final de 3×10^9 ufc/mL e manteve-se tudo a incubar a 37°C durante 30 minutos, sem agitação, e 30 minutos com agitação moderada. Efectuou-se a centrifugação das células a 5000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C e depois preparou-se nova suspensão com 25 mL de meio 2xYTAK. Deixou-se estas bactérias crescerem a 30°C de um dia para o outro com agitação. Os fagomídeos induzidos foram colhidos e purificados tal como descrito na secção 2C.

D. Selecção da segunda experiência

Efectuou-se a selecção da segunda experiência conforme explicitado nas secções 3B e 3C, com a excepção seguinte. Como carga de fagomídeos utilizou-se uma quantidade de fagomídeos equivalente a cerca de 100 vezes a biblioteca, provenientes da secção 3C. A quantidade de proteína Ang-2 biotinilada (secção 3A) a recobrir 'Dynabead M-280 Streptavidin' foi reduzida para 20 ng. As esférulas a que estavam ligados os fagos foram depois lavadas 10 vezes com uma mistura de 2% de leite-PBS; 10 vezes com uma mistura de 2% de BSA-PBS; 10 vezes com PBST, tendo a lavagem final

implicado um período de 60 minutos de incubação à temperatura ambiente em PBST. As esférulas foram depois lavadas duas vezes com PBS. As condições de eluição foram as mesmas da primeira experiência (secção 3B).

E. Selecção da terceira experiência

Efectuou-se a selecção da terceira experiência conforme explicitado nas secções 3B e 3C, com a excepção seguinte. Como carga de fagomídeos utilizou-se uma quantidade de fagomídeos equivalente a cerca de 10 vezes a biblioteca, provenientes da secção 3D. Utilizou-se cerca de 2 ng de proteína Ang-2 biotinilada (da secção 3A) para recobrir 'Dynabead M-280 Streptavidin'. As esférulas a que estavam ligados os fagos foram depois lavadas 10 vezes com uma mistura de 2% de leite-PBS; 10 vezes com uma mistura de 2% de BSA-PBS; 10 vezes com PBST, tendo a lavagem final implicado um período de 60 minutos de incubação à temperatura ambiente em PBST. As esférulas foram depois lavadas duas vezes com PBS. As condições de eluição foram as mesmas da primeira experiência (secção 3B).

F. Selecção da quarta experiência

Efectuou-se a selecção da quarta experiência conforme explicitado nas secções 3B e 3C, com a excepção seguinte. Como carga de fagomídeos utilizou-se uma quantidade de fagomídeos equivalente à biblioteca, provenientes da secção 3E. A quantidade de proteína Ang-2 biotinilada (secção 3A) a recobrir 'Dynabead M-280 Streptavidin' foi reduzida para 0,4 ng para as bibliotecas 25, 26 e 27. Para as bibliotecas 20 e 94, manteve-se a quantidade de cobertura igual à da terceira experiência, 2 ng. A biblioteca 99 não foi

utilizado no passo de selecção da quarta experiência. As condições de eluição foram as mesmas da primeira experiência (secção 3B).

4. ANÁLISE CLONAL

A. Preparação da placa principal

Recolheu-se cuidadosamente colónias singulares da selecção da segunda experiência e com elas fez-se a inoculação de placas de 96 cavidades contendo 120 µL de meio 2xYTAGT por cavidade. As placas de 96 cavidades ficaram a incubar a 30°C com agitação de um dia para o outro. Acrescentou-se 40 µL de glicerol a 60% a cada cavidade para armazenagem a -80

B. Protocolo ELISA para os fagomídeos

Com aliquotas de cerca de 2 µL de células provenientes da placa principal (da secção 4A anterior) efectuou-se a inoculação de uma nova placa de 96 cavidades 'Costar®' (Coming incorporated, Coming, NY, cat. #9794) que continha 100 µL de meio 2xYTAGT por cavidade, e deixou-se as células desta nova placa a crescerem a 37°C até ao valor aproximado de $DO_{600} = 0,5$.

Acrescentou-se a cada cavidade 40 µL de meio 2xYTAGT contendo o fago auxiliar M13K07 ($1,5 \times 10^{13}$ ufc/mL) e manteve-se a placa de 96 cavidades a incubar a 37°C durante 30 minutos sem agitação e durante mais 30 minutos com agitação moderada. Efectuou-se a centrifugação da placa a 2000 r.p.m. (centrifugadora de bancada Beckman CS-6R) durante 10 minutos a 4°C. Removeu-se os sobrenadantes das cavidades e com cada massa celular preparou-se nova

suspensão, utilizando 150 µL de meio 2xYTAK por cavidade. Manteve-se a placa a incubar a 30°C de um dia para o outro para a expressão dos fagomídeos.

Com a proteína Ang-2 humana recobriu-se uma placa de 96 cavidades 'Maxisorp' (NUNC) à razão de 1 µg/mL em meio 1xPBS a 4°C de um dia para o outro. Como controlo, utilizou-se uma solução contendo 2% de BSA (Sigma) com a qual se recobriu uma placa independente 'Maxisorp'. No dia seguinte, as culturas de células desenvolvidas de um dia para o outro foram centrifugadas a 2000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. Transferiu-se uma quantidade de 10 µL de sobrenadante de cada cavidade para uma nova placa de 96 cavidades que continham uma solução de BSA/PBS para diluir o sobrenadante à razão de 1:10. As misturas resultantes ficaram a incubar durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação para bloquear os fagomídeos. Entretanto, bloqueou-se uma placa recoberta com proteína Ang-2, utilizando para tal 400 µL de solução contendo 2% de BSA/PBS por cavidade durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação. Deitou-se fora a solução de BSA e lavou-se cada cavidade 3 vezes com solução de PBS. Após o último passo de lavagem, acrescentou-se 100 µL de soluções de fagomídeos bloqueados a cada cavidade da placa recoberta com proteína Ang-2 e também à placa de controlo e manteve-se tudo a incubar durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação. Deitou-se fora o líquido e lavou-se cada cavidade 3 vezes com solução de PBST. Acrescentou-se 100 µL de mAb anti-M13 conjugado com HRP (Amersham Pharmacia Biotech), com uma diluição de 15000 vezes, a cada cavidade das placas recobertas com a proteína Ang-2 e de controlo e manteve-se estas placas a incubar durante 1 hora à temperatura

ambiente com agitação. Mais uma vez, deitou-se fora o líquido de lavou-se cada cavidade três vezes com solução de PBST. Acrescentou-se às cavidades 100 µL de substratos quimioluminescentes 'LumiGLO' (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) e efectuou-se a leitura de cada cavidade com o aparelho "Luminoskan Ascent DLRearly (Labsystems, Franklin, MA).

C. Sequenciação dos clones de fagos

A reacção de PCR foi efectuada utilizando 1 µL de bactérias de cada cavidade da placa principal (secção 4A) como matriz. O volume de cada mistura de PCR foi de 50 µL, contendo tampão 1xPCR e 300 nM de cada um dos dois iniciadores:

5'-GTTAGCTCACTCATTAGGCAC-3' (SEQ ID NO: 256) e

5'-GTACCGTAACACTGAGTTTCG-3', (SEQ ID NO: 257);

dNTP 200 mM, MgCl₂ 2 mM e 2,5 U de polimerase do ADN de Taq (Roche Molecular Biochemicals). Utilizou-se o protocolo de 'GeneAmp PCR System 9700' (Applied Biosystems) para executar o programa seguinte: 94°C durante 5 minutos; 40 ciclos de (94°C durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos, 72°C durante 90 segundos); 72°C durante 10 minutos; arrefecimento para 4°C. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o estojo de purificação de PCR 'QIAquick 96' (QIAGEN Inc.) em conformidade com as instruções do fabricante. Todos os produtos de PCR purificados foram sequenciados com o iniciador 5'-TTACACTTTATGCTTCCG-3' (SEQ ID NO: 258), utilizando o sequenciador 'ABI 3770' (Perkin Elmer), em conformidade com as instruções do fabricante.

5. Ordenamento das sequências

As sequências de péptidos que foram obtidas a partir das sequências de nucleótidos (da secção 4C anterior) foram correlacionadas com dados do ensaio ELISA. Os clones que revelaram um valor de DO elevado nas cavidades recobertas com Ang-2 e um valor DO fraco nas cavidades recobertas com BSA foram considerados mais importantes. As sequências que ocorreram várias vezes também foram consideradas importantes. Para análise posterior e geração de peptícorpos foram escolhidas 24 sequências de péptidos da biblioteca 20, 26 sequências de péptidos da biblioteca 94 e 7 sequências de péptidos da biblioteca 99. Além disso, foram deduzidas e utilizadas para gerar peptícorpos 11 sequências de consenso das bibliotecas 20 e 94, 3 sequências de consenso das bibliotecas 26 e 99 e 2 da biblioteca 25. Os peptícorpos indicados no quadro 7 foram avaliados utilizando o protocolo ELISA de neutralização descrito no exemplo 10 desta memória descritiva. Os resultados estão ilustrados no quadro 7.

Quadro 7

Pc desenvolvidos com afinidade para Com 4 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
Con4-44 (C)	0,09	M-Fc-GGGGGAQ- PIRQEECDWDPWTCEHMQWEV-LE (SEQ ID NO: 259)
Con4-40 (C)	0,10	M-Fc-GGGGGAQ- TNIQEECEWDPWTCDHMPGK-LE (SEQ ID NO: 260)
Con4-4 (C)	0,12	M-Fc-GGGGGAQ- WYEQDACEWDPWTCEHMAEV-LE (SEQ ID NO: 261)
Con4-31 (C)	0,16	M-Fc-GGGGGAQ- NRLQEVCEWDPWTCEHMENV-LE (SEQ ID NO: 262)
Con4-C5 (C)	0,16	M-Fc-GGGGGAQ- AATQEECEWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 263)
Con4-42 (C)	0,17	M-Fc-GGGGGAQ- LRHQEGCEWDPWTCEHMFDFW-LE (SEQ ID NO: 264)
Con4-35 (C)	0,18	M-Fc-GGGGGAQ- VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG-LE (SEQ ID NO: 265)
Con4-43 (C)	0,18	M-Fc-GGGGGAQ- SISHEECEWDPWTCEHMQVG-LE (SEQ ID NO: 266)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para Con4 transformados	CI ₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
Con4-49 (C)	0,19	M-Fc-GGGGGAQ- WAAQEECEWDPWTCEHMGRM-LE (SEQ ID NO: 267)
Con4-27 (C)	0,22	M-Fc-GGGGGAQ- TWPQDKCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 268)
Con4-48 (C)	0,26	M-Fc-GGGGGAQ- GHSQEECGWDPWTCEHMGTS-LE (SEQ ID NO: 269)
Con4-46 (C)	0,26	M-Fc-GGGGGAQ- QHWQEECEWDPWTCDHMPSK-LE (SEQ ID NO: 270)
Con4-41 (C)	0,26	M-Fc-GGGGGAQ- NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR-LE (SEQ ID NO: 271)
Con4-36 (C)	0,28	M-Fc-GGGGGAQ- KSGQVECNWDPWTCEHMPRN-LE (SEQ ID NO: 272)
Con4-34 (C)	0,28	M-Fc-GGGGGAQ- VKTQEHCDWDPWTCEHMREW-LE (SEQ ID NO: 273)
Con4-28 (C)	0,30	M-Fc-GGGGGAQ- AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM-LE (SEQ ID NO: 274)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para Con4 transformados	CI ₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
Con4-39 (C)	0,30	M-Fc-GGGGGAQ- FVNQEDCEWDPWTCEHMPFM-LE (SEQ ID NO: 275)
Con4-25 (C)	0,31	M-Fc-GGGGGAQ- RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK-LE (SEQ ID NO: 276)
Con4-50 (C)	0,38	M-Fc-GGGGGAQ- HGQNMECEWDPWTCEHMFY-LE (SEQ ID NO: 277)
Con4-38 (C)	0,40	M-Fc-GGGGGAQ- PRLQEECVWDPWTCEHMPLR-LE (SEQ ID NO: 278)
Con4-29 (C)	0,41	M-Fc-GGGGGAQ- RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ-LE (SEQ ID NO: 279)
Con4-47 (C)	0,44	M-Fc-GGGGGAQ- QTSQEDCVWDPWTCDHMOVSS-LE (SEQ ID NO: 280)
Con4-20 (C)	0,48	M-Fc-GGGGGAQ- QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL-LE (SEQ ID NO: 281)
Con4-45 (C)	0,48	M-Fc-GGGGGAQ- WAQQECAWDPWTCDHMOVGL-LE (SEQ ID NO: 282)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para Con4 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
Con4-37 (C)	0,49	M-Fc-GGGGGAQ- LPQQEDCEWDPWTCEH MVRS-LE (SEQ ID NO: 283)
Con4-33 (C)	0,52	M-Fc-GGGGGAQ- PMNQVECDWDPWTCEH MPRS-LE (SEQ ID NO: 284)
AC2-Con4 (C)	0,52	M-Fc-GGGGGAQ- FGWSHGCEWDPWTCEH MGST-LE (SEQ ID NO: 285)
Con4-32 (C)	0,75	M-Fc-GGGGGAQ- KSTQDDCDWDPWTCEH MVGP-LE (SEQ ID NO: 286)
Con4-17 (C)	0,96	M-Fc-GGGGGAQ- GPRISTCQWDPWTCEH MDQL-LE (SEQ ID NO: 287)
Con4-8 (C)	1,20	M-Fc-GGGGGAQ- STIGDMCEWDPWTCAH MQVD-LE (SEQ ID NO: 288)
AC4-Con4 (C)	1,54	M-Fc-GGGGGAQ- VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 289)
Con4-1 (C)	2,47	M-Fc-GGGGGAQ- VLGGQGCQWDPWTC SHLEDG-LE (SEQ ID NO: 290)
Con4-CI (C)	2,75	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCEWDPWTC AHMQGG-LE (SEQ ID NO: 291)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para Con4 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
Con4-21 (C)	3,21	M-Fc-GGGGGAQ- TKCKSVCQWDPWTC SHMQSG-LE (SEQ ID NO: 292)
Con4-C2 (C)	3,75	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG-LE (SEQ ID NO: 293)
Con4-18 (C)	4,80	M-Fc-GGGGGAQ- WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP-LE (SEQ ID NO: 294)
Con4-19 (C)	5,76	M-Fc-GGGGGAQ- VVQVGM CQWDPWTCKHMLRQ-LE (SEQ ID NO: 295)
Con4-16 (C)	6,94	M-Fc-GGGGGAQ- AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV-LE (SEQ ID NO: 296)
Con4-11 (C)	9,70	M-Fc-GGGGGAQ- QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR-LE (SEQ ID NO: 297)
Con4-C4 (C)	9,80	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG-LE (SEQ ID NO: 298)
Con4-23 (C)	9,88	M-Fc-GGGGGAQ- TSQRVGCEWDPWTCQHLYT-LE (SEQ ID NO: 299)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para Con4 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
Con4-15 (C)	15,00	M-Fc-GGGGGAQ- QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS-LE (SEQ ID NO: 300)
Con4-9 (C)	20,11	M-Fc-GGGGGAQ- GTSPSPCQWDPWTCSHMVQG-LE (SEQ ID NO: 301)
Con4-10 (C)	86,61	M-Fc-GGGGGAQ- TQGLHQCEWDPWTCCKVLWPS-LE (SEQ ID NO: 302)
Con4-22 (C)	150,00	M-Fc-GGGGGAQ- VWRSQVCQWDPWTCNLGGDW-LE (SEQ ID NO: 303)
Con4-3 (C)	285,50	M-Fc-GGGGGAQ- DKILEECQWDPWTCQFFYGA-LE (SEQ ID NO: 304)
Con4-5 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- ATFARQCQWDPWTCALGGNW-LE (SEQ ID NO: 305)
Con4-30 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- GPAQEECEWDPWTCEPLPLM-LE (SEQ ID NO: 306)
Con4-26 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- RPEDMCSQWDPWTWHLQGYC-LE (SEQ ID NO: 307)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para Con4 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
Con4-7 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- LWQLAVCQWDPQTCDHMGAL-LE (SEQ ID NO: 308)
Con4-12 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- TQLVSLCEWDPWTCRLLDGW-LE (SEQ ID NO: 309)
Con4-13 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- MGGAGRCEWDPWTCQLLQGW-LE (SEQ ID NO: 310)
Con4-14 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- MFLPNECQWDPWTCSNLPEA-LE (SEQ ID NO: 311)
Con4-2 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- FGWSHGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 312)
Con4-6 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- WPQTEGCQWDPWTCRLLHGW-LE (SEQ ID NO: 313)
Con4-24 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- PDTRQGCQWDPWTCRLYG MW-LE (SEQ ID NO: 314)
AC1-Con4 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- TWPQDKCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 315)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para Con4 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
AC3-Con4 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ-DKILEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 316)
AC5-Con4 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ-AATQEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 317)
Pc desenvolvidos com afinidade para L1 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
L1-7 (N)	0,03	MGAQ-TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 318)
AC6-L1 (N)	0,03	MGAQ-TNYKPLDELDTLYEHWILQHSLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 319)
L1-15 (N)	0,04	MGAQ-QKYQPLDELDTLYDQFMLQQG-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 320)
L1-2 (N)	0,04	MGAQ-LNFTPLDELEQTLYEQWTLOQSLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 321)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para L1 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
L1-10 (N)	0,05	MGAQ- QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 322)
L1-13 (N)	0,05	MGAQ- QEYEPDELDETLYNQWMFHQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 323)
L1-5 (N)	0,05	MGAQ-VKYKPLDELDEILYEQQTFQER LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 324)
L1-C2 (N)	0,05	MGAQ- TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 325)
L1-C3 (N)	0,06	MGAQ- TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 326)
L1-11 (N)	0,07	MGAQ- QNFKPMDELEDTLYKQFLFQHS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 327)
L1-17 (N)	0,08	MGAQ- VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 328)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para L1 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
L1-12 (N)	0,08	MGAQ- YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 329)
L1-1 (N)	0,08	MGAQ-QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 330)
L1-4 (N)	0,08	MGAQ- VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 331)
L1-20 (N)	0,09	MGAQ- EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 332)
L1-22 (N)	0,09	MGAQ- YKFNPMDLEQTLYEEFLFQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 333)
L1-14 (N)	0,11	MGAQ- SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 334)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para L1 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
L1-16 (N)	0,11	MGAQ- QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 335)
L1-18 (N)	0,16	MGAQ-QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 336)
L1-3 (N)	0,16	MGAQ- TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 337)
L1-21 (N)	0,17	MGAQ- HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 338)
L1-CI (N)	0,56	MGAQ- QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 339)
L1-19 (N)	1,26	MGAQ- QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 340)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para L1 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
L1-9 (N)	1,62	MGAQ- SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 341)
Pc desenvolvidos com afinidade para Con1 transformados	CI₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
Con1-4 (C)	1,68	M-Fc-GGGGGAQ- SGQLRPCEEIFGCGTQNLAL-LE (SEQ ID NO: 342)
Con1-1 (C)	3,08	M-Fc-GGGGGAQ- AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA-LE (SEQ ID NO: 343)
Con1-6 (C)	8,60	M-Fc-GGGGGAQ- GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG-LE (SEQ ID NO: 344)
Con1-3 (C)	16,42	M-Fc-GGGGGAQ- APGQRPYDGMLGWPTYQRIV-LE (SEQ ID NO: 345)
Con1-2 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- QTWDDPCMHLGPVTWRRCL-LE (SEQ ID NO: 346)
Con1-5 (C)	Sem inibição	M-Fc-GGGGGAQ- FGDKRPLECMFGGPIQLCPR-LE (SEQ ID NO: 347)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para Con1 transformados	CI ₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
Original: Con1 (C)	26,00	M-Fc-GGGGGAQ-KRPCEEIFGGCTYQ- LE (SEQ ID NO: 348)
Pc desenvolvidos com afinidade para 12-9 transformados	CI ₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
12-9-3 (C)	0,81	M-Fc-GGGGGAQ- LQEWCEGVDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 349)
12-9-7 (C)	0,93	M-Fc-GGGGGAQ- MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM-LE (SEQ ID NO: 350)
12-9-6 (C)	0,95	M-Fc-GGGGGAQ- HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG-LE (SEQ ID NO: 351)
12-9-C2 (C)	1,41	M-Fc-GGGGGAQ- LQDYCEGVDPFTFGCENQR-LE (SEQ ID NO: 352)
12-9-5 (C)	1,56	M-Fc-GGGGGAQ- LLDYCEGVQDPFTFGCENLD-LE (SEQ ID NO: 353)
12-9-1 (C)	1,84	M-Fc-GGGGGAQ- GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT-LE (SEQ ID NO: 354)

(continuação)

Pc desenvolvidos com afinidade para 12-9 transformados	CI ₅₀ hAng-2:Tie2 (nM)	Sequência do peptícorpo (SEQ ID NO:)
12-9-4 (C)	2,05	M-Fc-GGGGGAQ- AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK-LE (SEQ ID NO: 355)
12-9-CI (C)	2,68	M-Fc-GGGGGAQ- LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 356)
12-9-2 (C)	8,42	M-Fc-GGGGGAQ- KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS-LE (SEQ ID NO: 357)
Original: 12-9 (C)	15,00	M-Fc-GGGGGAQ- FDYCEGVEDPFTFGCDNH-LE (SEQ ID NO: 358)

Exemplo 9

Foram testadas 6 amostras de peptícorpos anti-Ang-2 para se pesquisar a sua actividade de ligação a huAng2 (R&D Systems, BNO12103A) sobre BIAcore. Imobilizou-se proteína G numa micropeça CM5, em conformidade com o protocolo convencional de acoplamento de amins (BIAcore Inc.) e depois injectou-se os peptícorpos sobre uma superfície de proteína G para captura (RL - 100 Ru). Para se testar a ligação entre hAng2 e o peptícorpo capturado, injectou-se huAng2 nas concentrações entre 0,3 nM e 40 nM sobre as superfícies dos peptícorpos capturados e fez-se uma análise dos sensorgramas de ligação, utilizando o programa BIAevaluation 3.0 (BIAcore Inc.). O quadro 8 agrupa os resultados desta experiência.

Quadro 8

Peptícorpo	Lote n°	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
Con4-44 (C)	011702	2,1E-10	2,9E+05	5,9E-05
L1-7 (N)	022102	2,4E-10	3,7E+05	8,7E-05
L1-10 (N)	021302	7,7E-10	1,5E+05	1,1E-05
L1-21 (N)	021802	2,4E-10	5,6E+05	1,4E-05
Con4 (C)	33456-77	3,8E-10	5,3E+05	2,0E-05
2xCon4 (C) 1K	092501	3,4E-10	4,8E+05	1,6E-05

Exemplo 10**ELISA de neutralização**

Foram utilizados meios condicionados com Ang-2 de seres humanos, murinos, cães e ratos e com Ang-1 de seres humanos e de murinos, os quais foram diluídos em DMEM/50µg/mL BSA do modo seguinte: hAng-2 - diluição a

1:64; mAng-2 - diluição a 1:64; Ang-2 do rato - não diluída; Ang-2 do cão - diluição a 1:32; hAng-1 - diluição a 1:4; e mAng-1 - diluição a 1:4.

A intensidade com que cada um destes meios condicionados foi diluído foi determinada pela sua aptidão para se ligarem a hTie-2Fc 1 nM (utilizada sob a forma de uma molécula de Tie-2-Fc em que a parcela Tie-2 contém apenas a parte extracelular solúvel da molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI) a 50% do valor máximo possível de ligação (isto é, patamar). As placas de microtitulação foram recobertas com 100 µL dos meios condicionados diluídos. No caso dos protocolos ELISA de neutralização de Ang-2, os peptícorpos elegíveis anti-Ang-2 foram titulados para valores entre 62,5 nM a 0,015 pM em diluições reduzidas consecutivamente 4 vezes numa solução de PBS contendo cerca de 1% de BSA e cerca de 1 nM de Tie-2 (utilizada como molécula de Tie-2-Fc em que a parcela de Tie-2 contém apenas a parte extracelular solúvel da molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Nos protocolos ELISA de neutralização de Ang-1, os peptícorpos elegíveis anti-Ang-2 foram titulados para valores entre 1000 nM a 0,2 pM em diluições reduzidas consecutivamente 4 vezes numa solução de PBS contendo cerca de 1% de BSA e cerca de 1 nM de Tie-2 (utilizada como molécula de Tie-2-Fc em que a parcela de Tie-2 contém apenas a parte extracelular solúvel da molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI).

Depois de se ter acrescentado a cada cavidade cerca de 100 µL da solução contendo peptícorpo/Tie-2, manteve-se as placas a incubar de um dia para o outro à temperatura ambiente, tendo sido depois lavadas 5 vezes em PBS contendo

cerca de 0,1% de Tween-20 Após a lavagem, acrescentou-se cerca de 100 µL a cada cavidade contendo anticorpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., número de catálogo 557039), até se obter uma concentração final de cerca de 1 µg/mL, tendo finalmente as placas ficado a incubar durante cerca de 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, acrescentou-se cerca de 100 µL a cada cavidade que continha anti-IgG de murganho conjugado na cabra com HRP (Pierce Chemical Co., número de catálogo 31432), com uma diluição de 1:10000 em PBS contendo cerca de 1% de BSA.

As placas ficaram a incubar à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora, após o que foram lavadas 5 vezes com PBS contendo cerca de 0,1% de Tween-20. A seguir acrescentou-se a cada cavidade cerca de 100 µL de substrato TMB (SIGMA, número de catálogo T8665) e esperou-se que aparecesse uma cor azul. Seguidamente fez-se uma leitura da absorvência com um espectrofotómetro a 370 nm. Os resultados estão transpostos para o quadro 9 subsequente.

Quadro 9

Neutralização das interacções angiopoietina: Tie2, mediada pelos peptícorpos						
	hAng-2	mAng-2	rAng-2	cAng-2	hAng-1	mAng-1
Peptícorpo	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)
2xCon4 (C)	0,026	0,035	0,024	0,047	3,0	3,2
Con4 (C)	0,197	0,289	0,236	0,540	200	300
Con4-44 (C)	0,08	0,16	0,22	---	43	---
Con4-40 (C)	0,20	0,27	0,35	---	> 1000	---
L1-7 (N)	0,046	0,063	0,035	0,108	> 1000	> 1000
L1-21 (N)	0,179	0,249	0,204	0,608	> 1000	> 1000
L1-10 (N)	0,06	0,06	0,06	---	> 1000	---

Exemplo 11Estudo FarmacocinéticoParadigma de estudo

Foram utilizados murganhos CD-1 (machos) com massas corporais entre 20-30 g, divididos aleatoriamente em grupos de tratamento para cada peptícorpo (2xCon4-C, L1-7-N e L1-21-N). Os animais receberam uma única injeção de ampola grande por via IV (n = 38/grupo) ou uma única administração por via SC de 50 µg de peptícorpo (n = 34/grupo). As injeções foram administradas através da veia caudal e sob a pele por cima dos ombros, respectivamente, para as administrações pelas vias IV e SC.

Colheita de amostras de sangue e métodos analíticos

Foram colhidas amostras de sangue para cada medição da concentração dos peptícorpos de anti-Ang2 antes da administração das doses e nos momentos correspondentes a 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 216, 264, 312, e 336 horas após a administração das doses para os grupos SC e IV. Também foram obtidas amostras nos instantes correspondentes a 5 e 30 minutos após a administração das doses para os grupos IV.

Em cada um dos instantes referidos retirou-se sangue de dois animais, tendo sido depois sacrificados para se obter amostras. Por meio de uma punção cardíaca recolheu-se sangue (aproximadamente 0,50 mL) para dentro de tubos de ensaio de polipropileno com separador de soro de marca 'Microtainer®'. Manteve-se as amostras sobre gelo durante aproximadamente 20 minutos ou até ocorrer a formação de

coágulos. Separou-se o soro das amostras de sangue por centrifugação durante aproximadamente 10 minutos a 2-8°C, tendo sido preservadas à temperatura aproximada de -70°C até aos ensaios. Efectuou-se a medição de amostras recorrendo a um ensaio de fluorescência com resolução temporal verificada (TRF), com um limite inferior de quantificação (LLOQ) igual a 100 ng/mL. Efectuou-se a cobertura de placas de microtitulação "NUNC fluoroMaxisorp" com proteína recombinante Ang-2 de murganho. As placas foram depois bloqueadas com uma solução proteínica para redução da ligação não específica. Procedeu-se à preparação de amostras convencionais de controlo de qualidade e de amostras desconhecidas em tampão de ensaio contendo 10% de soro de murganho e com uma pipeta fez-se a sua introdução em cavidades de placas de microtitulação. Os peptícorpos ficaram especificamente ligados à Ang-2 imobilizada. Depois de se ter removido por lavagem as substâncias não ligadas (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.), acrescentou-se às cavidades um anticorpo monoclonal biotinilado anti-IgG humana conjugada na cabra (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.). Após um passo de lavagem para remoção de qualquer anticorpo monoclonal biotinilado não ligado, acrescentou-se às cavidades estreptavidina marcada com európio. Após a remoção do európio da estreptavidina não ligada, o európio ligado foi libertado da estreptavidina com uma solução acídica introduzida em cada cavidade com uma pipeta. Gerou-se um sinal fluorescente que foi lido com um leitor fluorométrico de Wallac. O intervalo experimental para a análise do peptícorpo anti-Ang-2 no soro de murganho foi de 0,078-5 µg/mL.

Análise farmacocinética

Os dados da média composta da concentração em função do tempo para cada grupo foram submetidos a uma análise não divisional, utilizando a aplicação WinNonlin Professional (Versão 3.3, Pharsight Corp., Mountain View, CA). Para a análise farmacocinética foram utilizados os tempos nominais de amostragem, à medida que as amostras eram colhidas a menos de 10% do tempo nominal. Todos os valores de concentração inferiores ao valor LLOQ foram considerados iguais a zero antes da análise farmacocinética. Foram estimados os seguintes parâmetros farmacocinéticos (PK):

. Calculou-se o período de semi-vida terminal ($t_{1/2}$) pela expressão $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}}$, em que k_{el} é a constante de velocidade terminal de primeira ordem estimada por regressão linear da fase de decaimento terminal log-linear.

. A área sob a curva de concentração sérica em função do tempo ($AUC_{(0-final)}$) foi estimada utilizando um método linear / log-trapezoidal entre o instante 0 e o instante final, momento da última concentração quantificável (C_{final})

. A área sob a curva desde o instante 0 até ao infinito ($ADC_{(0-\infty)}$) foi estimada como sendo a soma dos correspondentes valores de C_{final}/k_{el} e dos valores previstos

$$AUC_{(0-\infty)} = (ADC_{(0-final)}) + \frac{C_{final\ prevista}}{k_{el}}$$

. A biodisponibilidade absoluta (F), após a administração por via SC, foi calculada do modo seguinte:

$$F = \frac{AUC_{(0-\infty)sc}}{AUC_{(0-\infty)iv}} \times 100$$

Os resultados estão transpostos para a figura 2.

Exemplo 12

Foram utilizadas fêmeas de murganho pelado que foram injectadas subcutaneamente com 1×10^7 células A431 no dia 0 do estudo. Ao 3º dia, administrou-se o pepticorpo de Ang-2, 2xCon4-C, subcutaneamente segundo uma dose de 200 µg/animal/dia. Efectuou-se o registo nos volumes corporais e das massas corporais a intervalos regulares, conforme ilustrado na figura. Foram observadas diferenças significativas de crescimento tumoral entre o grupo tratado com o pepticorpo de Ang-2 comparativamente com o grupo de controlo com veículo e entre o grupo tratado com pepticorpo de controlo ($p < 0,0001$ comparativamente com cada controlo, utilizando o protocolo de medição repetitiva ANOVA, com o teste *post hoc* de Scheffe). O tratamento com este pepticorpo não teve nenhum efeito significativo sobre as massas corporais. Os resultados estão transpostos para a figura 3.

Exemplo 13Curva de crescimento de A431 *in vitro*

Com células A431 inoculou-se placas de cultura de tecidos de 96 cavidades à razão de 2000 células por cavidade, em 200 µL de DMEM enriquecido com 10% de soro de bovino fetal (FBS). A seguir aspirou-se o meio, 16 horas após a inoculação. Seguidamente acrescentou-se às cavidades, preparadas em triplicado, as substâncias seguintes: para cada cavidade, 100 µL de DMEM, FBS a 10%, pepticorpo de controlo negativo 4883 ou pepticorpo TN8-Con4 na concentração de 1 mg/mL. Efectuou-se a repetição das

mesmas preparações em 5 placas. O meio de uma das placas foi aspirado nos instantes correspondentes a 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o tratamento. Depois acrescentou-se a cada cavidade 100 µL de ácido tricloroacético a 10% (TCA) e guardou-se as placas a 4°C. Todas as placas foram recuperadas depois de a última placa ter estado em TCA a 10% durante um período mínimo de 4 horas. Sacudiu-se a solução de TCA a 10% e efectuou-se o enxaguamento dessas cavidades 5 vezes com água potável. As células foram então contrastadas com 100 µL de sulforrodamina B a 0,4% (Sigma S-9012) em ácido acético a 1% (Sigma A-6283) durante 10 minutos à temperatura ambiente e depois lavadas 5 vezes com ácido acético a 1%. Seguidamente, as placas ficaram a secar ao ar. Solubilizou-se o corante com 300 µL de Tris 120 mM não tamponado (pH>10) durante 2 horas num aparelho de agitação centrífugo. Depois fez-se uma leitura da densidade óptica (DO) a 540 nm num leitor de placas de microtitulação. Os resultados estão transpostos para a figura 4.

Exemplo 14

Injectou-se subcutaneamente fêmeas de murganhos pelados com 2×10^6 células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. Ao 3º dia, administrou-se-lhes subcutaneamente os peptícorpos de Ang-2 designados por L1-7-N, L1-21-N, Con4-C e 2xCon4-C, segundo uma dose de 14 µg/animal, duas vezes por semana. Como controlo positivo administrou-se três vezes por semana o anticorpo anti-Ang-2 designado por Ab536 segundo a dose de 47 µg/animal. Efectuou-se o registo dos volumes tumorais e das massas corporais a intervalos regulares.

Foram observadas diferenças significativas no crescimento tumoral entre cada um dos grupos tratados com o peptícorpo de Ang-2, comparativamente com o grupo de controlo com veículo e com o peptícorpo de controlo ($p < 0,0001$ comparativamente com cada controlo utilizando uma medição repetida ANOVA, com o teste *post hoc* de Scheffe). O tratamento com estes peptícorpos não teve nenhum efeito significativo sobre as massas corporais (resultados não apresentados). Os resultados estão ilustrados na figura 5.

Exemplo 15

Injectou-se subcutaneamente fêmeas de murganhos pelados com 2×10^6 células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. Ao 3º dia, administrou-se-lhes subcutaneamente o peptícorpo de Ang-2 designado por 2xCon4-C, com as doses de 14, 2,8 e 0,56 µg/animal, duas vezes por semana. Efectuou-se o registo dos volumes tumorais e das massas corporais a intervalos regulares, conforme ilustrado. Foram observadas diferenças significativas no crescimento tumoral entre as duas doses mais elevadas do grupo tratado com o peptícorpo de Ang-2, comparativamente com o grupo de controlo com veículo e com o péptido de controlo ($p = 0,003$ para a dose intermédia e $p < 0,0001$ para a dose elevada, utilizando o protocolo de medição repetida ANOVA, com o teste *post hoc* de Scheffe). O tratamento com estes peptícorpos não teve nenhum efeito significativo sobre as massas corporais. A linha a traço interrompido representa uma redução do número total n do grupo, de 10 para 9 animais, devido à morte de uma fêmea por razões desconhecidas. Os resultados estão ilustrados na figura 6.

Exemplo 16Peptícorpos anti-Ang-2 vs. tumores de xenoinxerto de Colo205

Injectou-se subcutaneamente fêmeas de murganhos pelados com 2×10^6 células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. Ao 3º dia, administrou-se-lhes subcutaneamente o peptícorpo de Ang-2 designado por 2xCon4-C ou o peptícorpo de controlo, com a dose de 350 µg/dia. Os tumores dos grupos tratados com o peptícorpo de controlo (conforme descrito no quadro 5) foram colhidos quer ao 14º dia (controlo ajustado ao tamanho) ou ao 18º dia (controlo ajustado ao tempo). Os tumores do grupo tratado com 2xCon4(C) foram depois colhidos ao 18º dia. Efectuou-se o registo dos volumes tumorais a intervalos regulares, conforme ilustrado. Foram observadas diferenças significativas no crescimento tumoral entre o grupo de controlo ajustado ao tempo e o grupo tratado com 2xCon4-C ($p=0,0154$ pelo protocolo de medição repetida ANOVA, com o teste *post hoc* de Scheffe). O tratamento com estes peptícorpos não teve nenhum efeito significativo sobre a massa corporal.

Os tumores preparados para a análise imagiológica foram bissectados coronalmente e uma metade foi congelada instantaneamente em OCT (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA). As criossecções foram contrastadas imuno-histoquimicamente, utilizando para tal anti-CD31 de murganho (número de catálogo 553370, BD PharMingen, San Diego, CA) com a concentração de 2 µg/mL, com DAB como cromogénio. As secções tumorais foram fotografadas

digitalmente com uma objectiva de ampliação 20X. Para cada tumor foram capturados quatro campos de "pontos da bússola" com 10 tumores por cada grupo de tratamento. Utilizou-se um sistema de análise de imagens 'MetaMorph' (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) para realçar no interior das imagens os vasos sanguíneos contrastados com CD31. As áreas de contrastação positiva com CD31 foram expressas em termos de uma proporção do tecido tumoral total contido em cada campo. Os resultados estão ilustrados na figura 7.

Exemplo 17

Injectou-se fêmeas de murganho pelado subcutaneamente com 2×10^6 Colo-205 células mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. O tratamento com 250 µg/animal, por via s.c. duas vezes por semana, com o peptícorpo de Ang-2 designado por 2xCon4-C, ou com o peptícorpo de controlo equivalente, começou ao 3º, 10º ou 15º dias do estudo. Efectuou-se o registo dos volumes tumorais e das massas corporais a intervalos regulares. Foram observadas diferenças significativas no crescimento tumoral entre o grupo tratado com o peptícorpo de Ang-2, comparativamente com o grupo de controlo tratado com veículo ($p=0,089$ para o grupo do 15º dia e $p<0,0001$ para os grupos do 3º e 10º dias, utilizando o protocolo de medição repetida ANOVA, com o teste *post hoc* de Scheffe). Os tratamentos com estes peptícorpos não tiveram nenhum efeito significativo sobre as massas corporais. Os resultados estão ilustrados na figura 8 (não estão indicadas as massas corporais).

Exemplo 18

Obteve-se um resumo de resposta completa (RC), utilizando o anticorpo Ab536 com uma dose de 47 µg/fêmea de murganho pelado, administrada intraperitonealmente três vezes por semana ou com o pepticorpo 2xCon4(C) administrado subcutaneamente segundo um programa de doses múltiplas em diferentes estudos a longo prazo (≥10 semanas de dosagem) em ambos os modelos de xenoenxerto de A431 e Colo-205. A abreviatura 'RC', aqui utilizada, significa um resultado em que não houve nenhum tumor mensurável após o tratamento. Os resultados estão ilustrados na figura 9.

Exemplo 19**a) Combinação de Pc com taxotere no modelo tumoral de Colo205**

Injectou-se subcutaneamente fêmeas de murganho pelado com 2×10^6 células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. Ao 14º dia do estudo iniciou-se os tratamentos com a) 350 µg/animal, por via s.c. duas vezes por semana, do pepticorpo de Ang-2 designado por 2xCon4-C, b) 20 mg/kg qwx3 i.p de taxotere, ou c) uma combinação de ambos. Efectuou-se o registo dos volumes tumorais e das massas corporais a intervalos regulares. Foram observadas diferenças significativas no crescimento tumoral entre todos os grupos de tratamento, comparativamente com o grupo de controlo tratado com veículo (($p < 0,0001$, utilizando o protocolo de medição repetida ANOVA, com o teste *post hoc* de Scheffe). Além disso, o grupo sujeito à terapia combinada foi significativamente diferente de qualquer dos grupos tratados com os agentes de monoterapia ($p < 0,0001$ vs.

2xCon-4-C e $p=0,0122$ vs taxotere). A linha a traço interrompido representa uma redução do numero total n do grupo de 10 para 9 animais, devido à morte de um animal por razões desconhecidas. O tratamento com estes pepticorpos não teve nenhum efeito significativo sobre as massas corporais. Os resultados estão ilustrados na figura 10a.

b) Combinação de Pc com 5-FU no modelo tumoral de Colo-205.

Injectou-se subcutaneamente fêmeas de murganho pelado com 2×10^6 células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. Ao 14º dia de estudo iniciou-se os tratamentos com a) 350 µg/animal, por via s.c. duas vezes por semana, de pepticorpo de Ang-2 designado por 2xCon4-C, b) 50 mg/kg qdx5 i.p de 5-FU, ou c) uma combinação de ambos. Efectuou-se o registo dos volumes tumorais e das massas corporais a intervalos regulares.

Foram observadas diferenças significativas no crescimento tumoral entre todos os grupos de tratamento comparativamente com o grupo de controlo tratado com veículo (($p < 0,0001$, utilizando o protocolo de medição repetida ANOVA, com o teste *post hoc* de Scheffe). Além disso, o grupo sujeito à terapia combinada foi significativamente diferente de qualquer dos grupos tratados com os agentes de monoterapia ($p < 0,0375$ vs. 2xCon4-C e $p = 0,0453$ vs 5-FU). Observou-se uma redução transitória das massas corporais no grupo tratado com 5-FU (18% ao 20º dia de estudo) e também com o grupo da terapia combinada (16% ao 20º dia do estudo), seguindo-se uma recuperação completa das massa corporais. Os resultados estão ilustrados na figura 10b.

Exemplo 20Modelo de artrite de adjuvante

Utilizou-se ratos de Lewis (machos (120-130 g, Charles River, Wilmington MA) que foram alojados em duas gaiolas cobertas com um filtro num ambiente com a temperatura controlada (temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidade relativa $50 \pm 20\%$) com um ciclo diário de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Os animais foram alimentados com ração alimentar para roedores, adquirida nos circuitos comerciais (formulação 8640;; Tek Lab, Madison, WI) e tiveram à sua disposição água potável filtrada *ad libitum*. Os teores dietéticos de cálcio e de fósforo foram respectivamente de 1,2% e 1,0%.

A artrite de adjuvante foi induzida por meio de uma injeção de 0,5 mg de microrganismos aniquilados termicamente.

Injectou-se intradermalmente na base da cauda *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco Laboratories, Detroit, MI) em suspensão em 0,05 mL de óleo de parafina (Crescent Chemical Co., Hauppauge, NY). O começo clínico da artrite ocorreu ao 9º dia, conforme indicado pelo inchaço das patas traseiras e pelas dificuldades locomotoras. Com a excepção do grupo tratado com 2xCon4(C) (que começou a ser tratado a partir do 1º dia após a imunização), os tratamentos foram administrados sob a forma de injeções subcutâneas diárias começando ao 9º dia após a imunização (antes do começo da artrite) e prosseguindo até ao 18º dia.

Monitorização clínica da artrite de adjuvante.

Avaliou-se a evolução da inflamação clinicamente, medindo intermitentemente o volume das patas traseiras, recorrendo à pletismografia de água em conformidade com os métodos descritos por Feige *et al.*, Cellular Molec. Life Sci., 57:1457-1470 (2000). Calculou-se a inibição da inflamação das patas com base na área sob a curva (AUC), utilizando a regra trapezoidal de acordo com a fórmula:

$$[1 - \{(\text{AdA tratado-normal}) / (\text{AdA não tratado - normal})\}] \times 100$$

Além disso, determinou-se a massa corporal total diariamente durante o regime de 9 dias de tratamento, como parâmetro suplementar, uma vez que se verificou que a perda de massa corporal evoluía em paralelo com a inflamação das articulações no modelo artrítico. Os animais foram sacrificados em atmosfera de CO₂ ao 18º dia.

Examinou-se a perda de densidade mineral óssea (BMD) por autópsia (18º dia após a imunização). Efectuou-se a remoção das patas traseiras junto à linha do pelo (mesmo próximo do tornozelo (jarrete do animal)), tendo sido depois mergulhadas numa solução de etanol a 70% e posteriormente fez-se uma inspecção radiológica, com orientação horizontal, utilizando um densitómetro com feixe de raios X e ventilador (modelo QDR-4500A; Hologic, Waltham, MA). Ver Feige *et al.*, *supra*. Após a inspecção radiológica, para delimitar o local que se pretendia analisar, posicionou-se convenientemente uma caixa rectangular (29x25 mm) centrada no calcâneo, tendo sido depois utilizados os algoritmos convenientes (aplicação

informática Hologic) para calcular a área óssea, o teor mineral ósseo e a densidade mineral óssea.

Todos os resultados foram expressos em termos de média $\pm$ desvio padrão. Utilizou-se um índice p de 0,05 para delimitar diferenças significativas entre grupos. Foram praticados os protocolos de Kruskal-Wallis da ANOVA e um teste U de Mann-Whitney, utilizando aplicações informáticas para fins estatísticos existentes no mercado (Statsoft v3.0; Statsoft, Tulsa, OK) com os dados clínicos disponíveis (variáveis contínuas).

Os resultados estão ilustrados nas figuras 11a, 11b e 11c, respectivamente.

Exemplo 21

Modelo de angiogénese corneal

Efeito de CON4(C) sobre a angiogénese nos ratos induzida por VEGF

Fez-se uma avaliação do peptícorpo de Ang-2 designado por CON4(C) no modelo de angiogénese corneal em ratos. A angiogénese foi induzida implantando um disco de nylon embebido em VEGF (ou na substância BSA de controlo) no estroma corneal (n=8/grupo). O peptícorpo TN8CON4-C foi administrado por injeção subcutânea com as doses de 1,0 ou 0,1 mg/rato/dia durante 7 dias. Outros dois grupos de animais foram tratados com a mesma dose de péptido 4883 de controlo negativo. Todos os grupos foram pré-tratados com uma dose única de substância de teste igual a 3,0 ou 0,3 mg, o que corresponde a três vezes a dose de manutenção de 1,0 ou de 0,1 mg (ver a figura). Após 7 dias de tratamento,

efectuou-se a determinação de dois pontos críticos vasculares para cada imagem digital da córnea do rato: o número de vasos que intersectam o ponto médio entre o disco e o limbo e a área dos vasos sanguíneos. O tratamento com TN8CON4-C inibiu significativamente a angiogénese induzida por VEGF de uma maneira dependente da dose ($p < 0,04$), ao passo que o tratamento com o peptícorpo de controlo não teve nenhum efeito significativo em nenhum dos pontos críticos. Não foi observada nenhuma prova explícita de toxicidade com base nas massas corporais dos animais tratados. Os resultados estão ilustrados na figura 12.

Exemplo 22

Mapeamento de epítomos

Efectuou-se a clonagem da Ang-2 humana (hAng-2) de comprimento completo (aminoácidos 1-495), do terminal N (aminoácidos 1-254) e do terminal C (aminoácidos 255-495) num vector de expressão do mamífero comandado por CMV com identificadores 6xHis do terminal C. Os três arquétipos resultantes mais um vector de controlo foram expressos transitoriamente em células 293T. Subsequentemente efectuou-se a colheita de meios condicionados a partir de células transfectadas e estimou-se o nível de expressão de Ang-2 nos meios pelo protocolo ELISA anti-6xHis e por absorção ocidental.

Determinou-se o epítipo de ligação dos anticorpos anti-Ang-2 e dos peptícorpos em função da sua aptidão para se ligarem a três versões de hAng-2 pelo protocolo ELISA, em conformidade com a seguinte metodologia: uma placa de ensaio de 96 cavidades de elevada ligação foi recoberta com

100 μ L de meios condicionados por cavidade, mantendo-se tudo a incubar a 37°C durante 1 hora. Os meios condicionados foram aspirados e a placa foi bloqueada com 200 μ L, por cavidade, de BSA a 5% em PBS à temperatura ambiente durante 1 hora. Depois aspirou-se a solução de bloqueio. Acrescentou-se a cada cavidade 100 μ L de anticorpo, pepticorpo ou Tie2-Fc, à razão de 1 μ g/mL em BSA a 1% em PBS e manteve-se tudo a incubar à temperatura ambiente durante 1 hora. Efectuou-se a lavagem das cavidades quatro vezes com 200 μ L de Tween a 0,1% em PBS. Acrescentou-se a cada cavidade 100 μ L de anti-IgG humana conjugada na cabra com HRP ou de anti-IgG de murganho igualmente conjugada na cabra e manteve-se tudo a incubar à temperatura ambiente durante 45 minutos. Depois efectuou-se a lavagem das cavidades com 200 μ L de Tween a 0,1% em PBS, 4 vezes. Seguidamente, acrescentou-se a cada cavidade 100 μ L de substrato TMB. Efectuou-se uma leitura de DO a 370 nm.

Os resultados estão ilustrados na figura 13a, figura 13b e figura 13c.

Exemplo 23

Devido a algumas limitações de sensibilidade próprias do ensaio 'BiaCore', avaliou-se também a afinidade de ligação, recorrendo a um ensaio 'Sepidyne KinExA'.

Testou-se a ligação de 2xCON4-C (Pb5714) à huAng-2 sobre 'KinExA' (Sapidyne, Boise, ID). Efectuou-se um revestimento prévio de esférulas 'Reacti-Gel 6x' (Pierce, Rockford, IL) com huAng-2 e efectuou-se o bloqueio com BSA. Manteve-se amostras de 2xCON4-C, nas concentrações de 10 pM e 30 pM, a incubar com diversas concentrações (0,3 pM - 3 nM) de huAng-2 à temperatura ambiente durante 8 horas antes

do processamento através das esférulas recobertas com huAng-2. Determinou-se a quantidade de peptícorpo ligado às esférulas por meio do anticorpo anti-Fc humano conjugado na cabra e marcado por fluorescência (Cy5) (Jackson Immuno Research, West Grove, PA). O sinal de ligação é proporcional à concentração do peptícorpo livre no equilíbrio.

Obteve-se a constante de dissociação em equilíbrio (K_D) por regressão não linear das curvas de competição, utilizando um modelo de curva dupla de ligação homogênea no local (KinEx™ software). A determinação de K_D permitiu concluir que era aproximadamente igual a 2 pM para a ligação de 2xCON4-C com huAng-2.

Conforme ilustrado na figura 14, utilizando o ensaio 'KinExA' comprovou-se que o peptícorpo 2xCon4 tinha uma afinidade de -2 pM para a hAng-2.

Exemplo 24

Péptidos aplicados em placas

Sintetizou-se o péptido L1-7 com um sintetizador '431 ABI', utilizando um protocolo de acoplamento convencional e duplo acoplamento a partir do resíduo 14 (met) ao resíduo 1 (Cys) do terminal N, sendo a numeração feita do terminal N para o terminal C.

Conjugação do péptido L1-7 com metoxi-polietilenoglicol-maleimida; MW: 5 KDa; designado "mPEG5K-(péptido L1-7)"

Tratou-se uma solução de 0,8 mg de péptido L1-7 em 400 µL de tampão 1 (fosfato 20 mM, EDTA 5 mM, pH 6,5) com 13,5 mg de metoxi-polietilenoglicol-maleimida (MW = 5KDa;

Shearwater Corp.); 0,27 mL de uma solução a 50,0 mg/mL em tampão 1. Manteve-se a mistura de reacção a incubar a 4°C de um dia para o outro e depois diluiu-se com 1,6 mL de tampão A (20 mM de Tris-cloridrato, pH 7,2) e submeteu-se a diálise numa cassete 'Slide-A-Lyzer' (3500 MWCO, Pierce) em presença do mesmo tampão. A mistura de reacção dialisada foi purificada por cromatografia de permuta iónica numa coluna com 1,0 mL de 'HiTrap Q Sepharose HP' (Amersham Biosciences Corp.). A fracção correspondente ao pico do produto foi objecto de eluição em duas fracções de 1,0 mL através de um gradiente, variando desde 100% de tampão A até 100% de tampão B (tampão A + NaCl 0,5 M) para 40 volumes de coluna. As fracções do produto combinadas foram concentradas até 250 µL, contendo a proteína na concentração de 0,23 mg/mL, utilizando para tal um dispositivo de centrifugação 'Microsep 1K' (Pall Life Sciences).

Conjugação do péptido L1-7 com 1,11-bis-maleimido-tetraetilenoglicol; designado por "PE04 (péptido L1-7)₂"

Tratou-se uma solução de 1,0 mg de péptido L1-7 em 500 µL de tampão 1 (fosfato 20 mM, EDTA 5 mM, pH 6,5) com 0,0375 mg de 1,11-bis-maleimidotetraetilenoglicol (Pierce) (0,0375 mL de uma solução a 0,1 mg/mL em tampão 1). Manteve-se a mistura de reacção a incubar a 4°C durante 3,33 horas e submeteu-se a diálise numa cassete 'Slide-A-Lyzer' (3500 MWCO, Pierce) em presença de tampão A (20 mM de Tris-cloridrato, pH 7,2). A mistura de reacção dialisada foi purificada por cromatografia de permuta iónica numa coluna com 1,0 mL de 'HiTrap Q Sepharose HP' (Amersham Biosciences Corp.). Efectuou-se a eluição do pico do

produto dimérico em 3 fracções de 1,0 mL por meio de um gradiente, variando desde 100% de tampão A até 100% de tampão B (tampão A + NaCl 0,5 M) para 40 volumes de coluna. As fracções do produto combinadas foram concentradas até 550 µL, contendo a proteína na concentração de 0,12 mg/mL, utilizando para tal um dispositivo de centrifugação 'Microsep 1K' (Pall Life Sciences).

Conjugação do péptido L1-7 com polietilenoglicol-bis-maleimida; MW 3.4 KDa; designado "PEG3.4K-(péptido L1-7)₂"

Tratou-se uma solução de 3,0 mg de péptido L-7 em 1,5 mL de tampão 1 (fosfato 20 mM, EDTA 5 mM, pH 6,5) com 1,125 mg de polietilenoglicol-bis-maleimida (MW = 3,4 KDa; Shearwater Corp.); 0,563 mL de uma solução a 2,0 mg/mL em tampão 1. Manteve-se a mistura de reacção a incubar a 4°C de um dia para o outro e submeteu-se a diálise numa cassette 'Slide-A-Lyzer' (3500 MWCO, Pierce) em presença de tampão A (20 mM de Tris-cloridrato, pH 7,2). A mistura de reacção dialisada foi purificada por cromatografia de permuta iónica numa coluna com 5,0 mL de 'HiTrap Q Sepharose HP' (Amersham Biosciences Corp.). Efectuou-se a eluição do pico do produto em 3 fracções de 3,0 mL por meio de um gradiente, variando desde 100% de tampão A até 100% de tampão B (tampão A + NaCl 0,5 M) para 40 volumes de coluna. As fracções do produto combinadas foram concentradas até 850 µL, contendo a proteína na concentração de 0,24 mg/mL, utilizando para tal um dispositivo de centrifugação 'Microsep 1K' (Pall Life Sciences).

Os resultados da espectroscopia de massa em 'MALDI-TOF' foram os seguintes:

Amostra	Identidade	EM Exp.	EM Obs.
1	L1-7 (péptido não PEGilado)	3 545	3 538,7
2	mPEGSK- (péptido L1-7)	8 500	8 851
3	PEO4 (péptido L1-7) ₂	7 443	7 446,29
4	PEG3.4K (péptido L1-7) ₂	10 550	10 552 6 888,61 3 550,13

Faz-se observar que o índice "2" indica que há dois péptidos por cadeia polimérica, um localizado em cada extremidade do polímero.

Determinação de CI₅₀

Determinou-se o valor de CI₅₀ para inibição da interacção hAng2:hTie2-Fc para os péptidos L1-7 livre e PEGilado, recorrendo ao protocolo ELISA de neutralização, conforme descrito no Exemplo 2. No protocolo ELISA de neutralização, as placas de microtitulação, às quais se ligou o polipéptido de Ang-2, foram preparadas conforme descrito no exemplo 2 para o protocolo ELISA de afinidade. Os péptidos elegíveis L1-7 PEGilado e livre anti-Ang-2 foram titulados desde 1000 nM até 0,2 pM em diluições com redução de concentração para 4 vezes menos, consecutivamente, numa solução de PBS contendo cerca de 1% de BSA e cerca de 1 nm de Tie-2 (fornecida como molécula Tie-2-Fc em que a parcela de Tie-2 contém apenas a parte extracelular solúvel da molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Depois de se ter acrescentado a cada cavidade cerca de 100 µL da solução de anticorpo/Tie-2, manteve-se as placas a incubar de um dia para o outro à temperatura ambiente e

depois efectuou-se a sua lavagem 5 vezes em PBS contendo cerca de 0,1% de Tween-20. Após a lavagem, acrescentou-se a cada cavidade cerca de 100 μ L de anticorpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., número de catalogo 557039) até se obter uma concentração final de cerca de 1 μ g por mL, tendo as placas ficado a incubar durante cerca de 1 hora à temperatura ambiente. A seguir acrescentou-se a cada cavidade 100 μ L de anti-IgG de murganho conjugado na cabra com HRP (Pierce Chemical CO., número de catalogo 31432) até se obter uma diluição de 1:10000 em PBS contendo cerca de 1% de BSA. Manteve-se as placas a incubar à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora, após o que se efectuou a sua lavagem 5 vezes com PBS contendo cerca de 0,1% de Tween-20. Seguidamente acrescentou-se a cada cavidade 100 μ L de substrato TMB (descrito *supra*) e esperou-se pelo aparecimento de uma cor. A seguir fez-se uma leitura de absorvência num espectrofotómetro a 370 nm.

Os péptidos L1-7 (C-GGGGG-AQ-TNFMDDLEQRLYEQFILQQG-LE) (SEQ ID NO: 359) continham: uma cisteína no terminal N para acoplamento a PEG e um *linker* 5Gly. As sequências de flanqueamento AQ e LE estavam presentes tanto no clone do fago original como no peptícorpo. Os resultados CI_{50} de inibição de hAng-2:Tie2 são os seguintes:

Péptido	CI_{50} (nM)
Péptido L-7	0,49
mPEG5K (péptido L1-7)	11,7
PEO4 (péptido L1-7) ₂	0,064
PEG3.4K (péptido L1-7) ₂	0,058

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> AMGEN INC.

<120> AGENTES DE LIGAÇÃO ESPECÍFICOS DA ANGIOPOIETINA-2 HUMANA

<130> A-801 B

<140> AINDA NÃO FOI ATRIBUÍDO

<141> 2002-10-11

<150> US 60/414 155

<151> 2002-09-27

<150> US 60/328 624

<151> 2001-10-11

<160> 359

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptidos de ligação a Ang-2

<400> 1

Lys Arg Pro Cys Glu Glu Met Trp Gly Gly Cys Asn Tyr Asp
1 5 10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptidos de ligação a Ang-2

<400> 2

His Gln Ile Cys Lys Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His Trp
 1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipetido de ligação a Ang-2

<400> 3

Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln
 1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipetido de ligação a Ang-2

<400> 4

Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met
 1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido de ligação a Ang-2

<400> 5

Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp
 1 5 10 15

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido de ligação a Ang-2

<400> 6

Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe
1 5 10 15

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptidos de ligação a Ang-2

<400> 7

Gln Tyr Gly Cys Asp Gly Phe Leu Tyr Gly Cys Met Ile Asn
1 5 10

<210> 8

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 8

acaaacaaac atatgggtgc acagaaagcg gccgcaaaaa aactcgaggg tggaggcggt 60
ggggaca 67

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 9

ggcctact ggccggtc 20

<210> 10

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 10

cgtaagggt taagaaaga aaag 25

<210> 11

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 11

tttgttgat ccattactcg agttttttg cggccgcttt ctgtgcacca ccaccctcac 60
ctttac 66

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (32)..(32)

<223> xaa = Fc

<400> 12

```

Met Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu
 1          5          10          15
Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
          20          25          30

```

<210> 13

<211> 29

<212> PRT

40 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (29)..(29)

<223> xaa = Fc

<400> 13

```

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
 1          5          10          15
Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
          20          25

```

<210> 14

<211> 51

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (51)..(51)

<223> Xaa = Fc

<400> 14

```

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
 1          5          10
Phe Thr Phe Gln Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser
          20          25
Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly
          35          40          45
Gly Gly Xaa
          50

```

<210> 15

<211> 60

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (60)..(60)

<223> xaa = Fc

<400> 15

Met Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu
 1 5 10 15

Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe
 35 40 45

Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 50 55 60

<210> 16

<211> 56

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (56)..(56)

<223> xaa = Fc

<400> 16

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro
 20 25 30

Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln
 35 40 45

Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 50 55

<210> 17

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (26) .. (26)

<223> Xaa = Fc

<400> 17

Met Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu
1 5 10 15

His Met Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
20 25

<210> 18

<211> 45

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (45) .. (45)

<223> Xaa = Fc

<400> 18

Met Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly
1 5 10 15

Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser
20 25 30

Gly Ser Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
35 40 45

<210> 19

<211> 62
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptícorpo capaz de se ligar a Ang-2
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (62)..(62)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 19

```

Met Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu
 1          5          10          15

His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser
          20          25          30

Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro
 35          40          45

Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 50          55          60

```

<210> 20
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptícorpo capaz de se ligar a Ang-2
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 20

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu
 20 25 30

<210> 21

<211> 53

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 21

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Lys
 20 25 30

Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr
 35 40 45

Phe Gln Gln Leu Glu
 50

<210> 22

<211> 59

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 22

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
1      5      10
Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly
20      25      30
Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
35      40      45
Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu
50      55

```

<210> 23

<211> 25

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Pepticorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> xaa = Fc

<400> 23

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp
1      5      10      15
Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
20      25

```

<210> 24

<211> 47

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> xaa = Fc

<400> 24

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln
20 25 30

Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
35 40 45

<210> 25

<211> 61

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 25

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp
 1 5 10 15

Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser
 20 25 30

Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu
 35 40 45

Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
 50 55 60

<210> 26

<211> 75

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (75)..(75)

<223> Xaa = Fc

<400> 26

Met Gly Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
 20 25 30

Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60

Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 65 70 75

<210> 27

<211> 72

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> xaa = Fc

<400> 27

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Lys
20 25 30

Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr
35 40 45

Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro
50 55 60

Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
65 70

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (30)..(30)

<223> xaa = Fc

<400> 28

Met Gly Ala Gln Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr
 1 5 10 15

Phe Gly Cys Asp Asn His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25 30

<210> 29

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 29

Met Gly Ala Gln Gln Tyr Gly Cys Asp Gly Phe Leu Tyr Gly Cys Met
 1 5 10 15

Ile Asn Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25

<210> 30

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 30

Met Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Met Trp Gly Gly Cys Asn
 1 5 10 15

Tyr Asp Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25

<210> 31

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 31

Met Gly Ala Gln His Gln Ile Cys Lys Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys
 1 5 10 15

His Trp Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25

<210> 32

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpo capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 32

Met Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Gly Cys Thr
 1 5 10 15

Tyr Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25

<210> 33

<211> 784

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a
 Ang-2

<400> 33

atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc 60
 actttccagc agctcgaggg tggaggcggg ggggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc 120
 ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gttttcctct tccceccaaa acccaaggac 180

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa 240
 gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 300
 aagtcgctgg aggagcagta caacagcagc taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 360
 caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca 420
 gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 480
 acctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 540
 aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 600
 aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag 660
 ctacacgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 720
 gaggtcttgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtcttcggg taaataatgg 780
 atcc 784

<210> 34

<211> 768

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 34

```

atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag    60
cagctcgagg gtggaggcgg tggggacaaa attcacacat gtccaccttg ccagcacct    120
gaactcctgg ggggaccgtc agttttcttc tccccccaa aaccaagga caccctcatg    180
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agacctgag    240
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg    300
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgttc tcacctctct gcaccaggac    360
tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag gtctccaaca aagccctccc agccccctc    420
gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc    480
ccatcccggy atgagctgac caagaaccag gtcagcttga cctgcctggt caaaggcttc    540
tatccacggg acatgcccggt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag    600
accargcctc cgtgcttga ctccgacggt tcttcttctc tctacagcaa gctcacctg    660
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg    720
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaataa    768

```

<210> 35

<211> 834

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 35


```

atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag    60
cagggatccg gttctgctac tggtaggttc ggctccaccg caagctctgg ttcaggcagt    120
ggcactcatc tcgaggggtg aggcgggtgg gacaaaactc acacatgtcc accttgccca    180
gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtt ttctcttctc ccccaaaacc caaggacacc    240
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac    300
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggctgaggagg tgcataatgc caagacaaag    360
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtctctac cgtcctgcac    420
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc    480
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc    540
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gccctgacctg cctggtcaaa    600
ggcttctatc ccagcgacat cgcctgagg tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac    660
tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc    720
accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag    780
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctcctgt ctccgggtaa ataa          834

```

<210> 36

<211> 861

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a
Ang-2

<400> 36

```

atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc    60
actttccagc aggggtgggg tgggtggggc ggtggtaagt tcaaccact ggatgagctg    120
gaagagactc tgtatgaaca gttcacttc cagcaactcg aggggtggagg cgggtggggac    180
aaaactcaca catgtccacc ttgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagttttc    240
ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc    300
gtgggtgggg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc    360

gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt    420
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc    480
aaggctccca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg    540
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac    600
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaagc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg    660
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac    720
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggiggca gcaggggaac    780
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc    840
tcctgtctc cgggtaaata a                                         861

```

<210> 37

<211> 849

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN encoding Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 37

```

atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag    60
caggggtggtg gtggtggcgg tggtaagttc aacccactgg atgagctgga agagactctg   120
tatgaacagt tcactttcca gcaactcgag ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca   180
tgtccacctt gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagttttcct cttcccccca   240
aaaccaagg acaccctcat gatctcccg accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac   300
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat   360
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc   420
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac   480
aaagccctcc cagcccccct cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggcca gccccgagaa   540
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg   600
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg   660
cagccggaga acaactacaa gaccacgect cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc   720
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc   780
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg   840
ggtaaataa

```

<210> 38

<211> 759

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 38

```

atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacccatgga cttgcgaaca catgctcgag    60
ggtaggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gccagcacc tgaactcctg   120
gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg   180
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc   240
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag   300
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat   360
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc   420
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg   480
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc   540
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct   600
cccgtagctg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcacctg ggacaagagc   660
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac   720
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa    759

```

<210> 39

<211> 816

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 39

```

atgcaggaag aatgcgaatg ggacccatgg acttgccaac acatgggatac cggttctgct    60
actgggtggtt ccggctccac cgcgaagctct ggttcaggca gtgcgactca tctcgaggggt    120
ggaggcggtg gggacaaaac tcacacatgt ccaccttgcc cagcacctga actcctgggg    180
ggacegtcag ttttctctt cccccaaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggaac    240
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac    300
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac    360
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc    420

```

```

aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc    480
tccaaagcca aagggcagcc cggagaacca cagggtgtaca cctgcccc atcccggtat    540
gagctgacca agaaccaggt cagctgacc tgcctggtca aaggctteta tccagcgac    600
atgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc    660
gtgctggact cggacggctc ettcctctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg    720
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggetctgca caaccactac    780
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaataa                                816

```

<210> 40

<211> 867

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptidocorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 40

```

atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacccatgga cttgcgaaca catgggatcc      60
ggttctgcta ctggtgggtc cggctccacc gcaagctctg gtcaggcag tgcgactcat      120
caggaagaat gcgaaatggga cccatggact tgcgaacaca tgctcgaggg tggaggcggt      180
ggggacaaaa ctcacacatg tccacctgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      240
gttttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc      300
acatgcgtgg tggtygacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      360
gacggcgtag aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      420
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      480
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc      540
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc      600
aagaaccagg tcagcctgac ctgectggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg      660
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgectcc cgtgctggac      720
tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag      780
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacycagaag      840
agcctctccc tgtctccggg taaataa                                           867

```

<210> 41

<211> 774

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 41

```

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc    120
acatgcgttg tggtagacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggaacagta caacagcacg    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    300
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgectggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggct ctttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag    660
agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtggtggtg cacagaaatt caaccgcgtg    720
gacgagctgg aagagactct gtacgaacag ttacttttc aacagctcga gtaa    774

```

<210> 42

<211> 840

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 42

```

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttcctct tccccctaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc    120
acatgcgtagg tggtagacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtagg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg    240
taccgtgtagg tcagcgtctt caccgtcttg caccaggact ggtgaatgg caaggagtac    300
aagtgcaggg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acagctgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catgcctgtg    480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540

tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cagcagaag    660
agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtggtggtg cacagggatc cggttctgct    720
actggtgggt cgggtccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca taaattcaac    780
ccgctggacg aactggaaga aactctgtac gaacagttca ctttcagca actcgagtaa    840

```

<210> 43

<211> 858

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 43


```

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga ccttgagggtc    120
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    300
aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaacat ctccaaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggct cttcttctct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag    660
agcctctccc tgtctccggg taaagggtga ggtgggtggg cacagaaatt caaccgctg    720
gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag ttcactttcc agcaggggtg tgggtggtgt    780
ggcgggtgta agttcaaccc actggatgag ctggaagaga ctctgtatga acagttcact    840
ttccagcaac tcgagtaa                                858

```

<210> 44

<211> 756

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 44

```

atggacaaaa ctacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccttgaggtc    120
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggcagaatgg caaggagtac    300
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaacat ctccaaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcttggc aaaggttct atccagcga catcgccgtg    480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggtt ctttcttct ctacagcaag ctccacctgg acaagagcag gtggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctc acaaccacta cacgcagaag    660
agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtggtggtg cacagcagga agaatgcgaa    720
tgggacccat ggacttgca acacatgctc gactaa                                756

```

<210> 45

<211> 822

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 45

```

atggacaaaa ctcacacatg tccacettgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga ttccccggac ccctgaggtc    120
acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcagc    240
taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtcttg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    300
aagtgcaggg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggte aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggct cttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgttc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag    660

agcctctccc tgctccggg taaagggtga ggtgggtgtg cacagggatc cggttctgct    720
actggtggtt ccggtccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca tcaggaagaa    780
tgcgaatggg acccatggac ttgcgaacac atgctcgagt aa                        822

```

<210> 46

<211> 864

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 46

```

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactectggg gggaccgtca    60
gttttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc    120
acatgcggtg tgggtggacgt gagccaagaa gaccttgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcggtg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggtgaatgg caaggagtac    300
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaaccat ctccaaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcttggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggtt ctttcttct ctacagcaag ctccaccgtg acaagagcag gtggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cagcgagaag    660
agcctctccc tgtctcggg taaaggtgga ggtgggtggtg cacagcagga agaatgcgaa    720
tgggacccat ggacttgca acacatggga tccggttctg cractgggtg ttccggctcc    780
accgcaagct ctggttcagg cagcgcgact catcaggaag aatgcgaatg ggacccatgg    840
acttgcaac acatgctcga gtaa                                           864

```

<210> 47

<211> 906

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 47

```

atgggtgcac aggaagaatg cgaatgggac ccatggactt gcgaacacat ggggtggtggt    60
gggtggtggcg gtggtaaatt caacccgctg gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag    120
ttcaactttcc agcagggatc cggttctgct actggttggtt ccggtccac cgcaagctct    180
ggttcaggca gtgcgactca tctcgagggt ggaggcggtg gggacaaaac tcacacatgt    240
ccaccttgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag ttttctctt cccccaaaa    300
cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgagggtca catgctggtt ggtggacgtg    360
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat    420
gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc    480
accgtctctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa    540
gccctcccag ccccatcgga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca    600
cagggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc    660
tgcttgggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag    720
ccggagaaca actacaagac caagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcttc    780
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtctc    840
gtgatgcatg aggtctctga caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt    900
aaataa                                           906

```

<210> 48

<211> 897

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 48

```

atggacaaaa etcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttccctt tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccttgaggtc    120
acatggcgtg tgggtggact gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcag    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    300
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaagacc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccaagcctcc cgtgtggac    540
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag etcacctggg acaagagcag gtggcagcag    600

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag    660
agcctctccc tgtctccggg taaagggtga ggtgggtggg cacagggatc cgttctgtct    720
actgggtggt cgggtccac cgcaagctct gggtcaggca gtgcgactca taaattcaac    780
ccgttgagcg aactggaaga aactctgtac gaacagttca cttccagca ggggtgggtggc    840
gggtgtcagg aagaatgcga atgggaccca tggacttgcg aacacatgct cgagtaa    897

```

<210> 49

<211> 771

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 49

```

atgggtgcac agttcgacta ctgcgaaggt gttgaagacc cgttcacttt cggttgcgac    60
aaccacctcg aggggtggagg cgggtggggac aaaactcaca catgtccacc ttgcccagca    120
cctgaactcc tgggggggacc gtcagttttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccttc    180
atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacctt    240
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg    300
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag    360
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aagggtctca acaaagccct cccagccccc    420
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggc cagccccgag aaccacaggt gtacacctg    480
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc    540
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac    600
aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc    660
gtggacaaga gcagggtggc gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct    720
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaata a          771

```

<210> 50

<211> 759

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 50

```

atgggtgcac agcagtacgg ttgcgacggg tttctgtacg gttgcatgat caacctcgag    60
ggtagggaggcg gtgggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg   120
gggggaccgt cagttttcct ctcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccgg   180
acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc   240
aactgggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag   300
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat   360
ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc   420
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acacctgcc ccatccccgg   480
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc   540
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt   600
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc   660
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac   720
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa    759

```

<210> 51

<211> 759

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 51


```

atgggtgcac agaaacgccc atgcgaagaa atgtggggtg gttgcaacta cgacctcgag    60
ggtagggggc gtggggacaa aactcacaca tgtccacatt gcccagcacc tgaactectg   120
gggggaccgt cagttttcct ctccccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg   180
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtagac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc   240
aactggtacg tggacygcgt ggaggtagat aatgccaaag caaagccgcg ggaggagcag   300
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggtgaat   360
ggcaaggagt acaagtgcac ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc   420
atctccaaag ccaaaggcca gcccagagaa ccacagggtt acaccctgcc cccatcccg   480
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaggctt ctatccagc   540
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt   600
cccgtagctg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc   660
aggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac   720
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa    759

```

<210> 52

<211> 759

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 52

```

atgggtgcac agcaccagat ctgcaaattg gacccgtgga cctgcaaaca ctggctcgag    60
gggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gccagcacc tgaactcttg    120
gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctccgg    180
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc    240
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag    300
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat    360
ggcaaggagt acaagtqcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc    420
atctccaaag ccaaaggcca gccccgagaa ccacagggtgt acaccctgcc cccatcccg    480
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc    540
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct    600
cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agetcaccgt ggacaagagc    660
agggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac    720
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa    759

```

<210> 53

<211> 759

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<400> 53

```

atgggtgcac agaaacgtcc atgcgaagaa atcttcggtg gttgcacctt ccagctcgag    60
gggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gccagcacc tgaactcttg    120
gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctccgg    180
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc    240
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga_ caaagccgcg ggaggagcag    300

```

```

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggetgaat 360
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagcctccc cagcccccac cgagaaaacc 420
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 480
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 540
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 600
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 660
agggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 720
tacaacgaga agagcctctc cctctctccg ggtaaataa 759

```

<210> 54

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 54

```

cggcgcaact atcggatca agctg 25

```

<210> 55

<211> 26

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 55

```

catgtaccgt aacactgag tggc 26

```

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Motivos de consenso gerados pelas bibliotecas TN8-IX
Library

<220>

<221> características diversas

<222> (7, 12 e)..(14)

<223> Xaa refere-se a qualquer aminoácido que ocorre naturalmente.

<400> 56

```

      Lys Arg Pro Cys Glu Glu Xaa Trp Gly Gly Cys Xaa Tyr Xaa
      1          5          10

```

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Motivos de consenso gerados pelas bibliotecas TN8-IX

<220>

<221> misc eature

<222> (7, 12 e)..(14)

<223> Xaa refere-se a qualquer aminoácido que ocorre naturalmente.

<400> 57

```

      Lys Arg Pro Cys Glu Glu Xaa Phe Gly Gly Cys Xaa Tyr Xaa
      1          5          10

```

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> consensus motifs generated from TN8-IX

<220>

<221> características diversas

<222> (1, 2, 3, 5 e)..(13)

<223> Xaa refere-se a qualquer aminoácido que ocorre naturalmente.

<400> 58

Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	Xaa	Met
1				5					10				

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Consensus motif generated from TN12-I

<220>

<221> características diversas

<222> (3, 8, 10-14 e)..(18)

<223> Xaa refere-se a qualquer aminoácido que ocorre naturalmente.

<400> 59

Trp	Ser	Xaa	Cys	Ala	Trp	Phe	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Arg
1				5				10						15	

<210> 60

<211> 227

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fc 1961 humano

<400> 60

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

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Motivos de consenso gerados pelas bibliotecas TN8-IX

<220>

<221> características diversas

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 e)..(14)

<223> Xaa refere-se a qualquer aminoácido que ocorre naturalmente.

<400> 61

```

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Tyr Trp Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Motivos de consenso gerados pelas biblioteca TN8-IX

<220>

<221> características diversas

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 e)..(14)

<223> Xaa refere-se a qualquer aminoácido que ocorre naturalmente.

<400> 62

```

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Tyr Thr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Motivos de consenso gerados pelas biblioteca TN8-IX

<220>

<221> características diversas

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 e)..(14)

<223> Xaa refere-se a qualquer aminoácido que ocorre naturalmente.

<400> 63

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Phe Trp Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Motivos de consenso gerados pelas biblioteca TN8-IX

<220>

<221> características diversas

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 e)..(14)

<223> Xaa refere-se a qualquer aminoácido que ocorre naturalmente.

<400> 64

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Phe Thr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Articial sequence

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 65

Trp Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 66

Trp Asp Pro Trp Thr Cys
1 5

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido acídico ou polar neutro

<400> 67

Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido acídico ou polar neutro

<400> 68

Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys
1 5

<210> 69

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (1, 2 e)..(3)

<223> cada Xaa representa independentemente resíduos aminoácidos.

<220>

<221> características diversas

<222> (5)..(5)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (12)..(12)

35 <223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (13)..(13)

40 <223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico.

<220>

<221> características diversas

<222> (14)..(14)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro.

<400> 69

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Xaa Xaa Xaa

1

5

10

<210> 70

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (1 e)..(15)

<223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (2 e)..(16)

<223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico.

<220>

<221> características diversas

<222> (3-6, 18, 19 e).. (20)

<223> cada Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (8)..(8)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (17)..(17)

<223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro.

<400> 70

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Xaa Xaa
1           5           10           15

```

```

Xaa Xaa Xaa Xaa
                20

```

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro.

<220>

<221> características diversas

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é um A, D ou E.

<220>

<221> características diversas

<222> (6)..(6)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido ácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (7)..(7)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (8)..(8)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico.

<400> 71

Pro	Xaa	Asp	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Tyr
1				5					10

<210> 72

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (1,4 e)..(20)

<223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (2, 15, 16 e)..(21)

<223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido polar neutro ou básico.

<220>

<221> características diversas

<222> (3, 17 e)..(18)

<223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro.

<220>

<221> características diversas

<222> (6)..(6)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro.

<220>

<221> características diversas

<222> (8)..(8)

<223> Xaa é um A, D ou E.

<220>

<221> características diversas

<222> (10)..(10)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido ácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (11)..(11)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (12)..(12)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico.

<220>

<221> características diversas

<222> (19 e)..(22)

<223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro,polar neutro ou básico.

<400> 72

Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (3)..(3)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido polar neutro.

<220>

<221> características diversas

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido acídico.

<220>

<221> características diversas

<222> (5)..(5)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido polar neutro ou acídico.

<220>

<221> mise_featura

<222> (6 e)..(7)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro.

<400> 73

Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly
 1 5

<210> 74

<211> 20
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2
<220>
<221> características diversas
<222> (1, 2, 4, 13, 14, 19 e)..(20)
<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro.
<220>
<221> características diversas
<222> (3, 9 e)..(17)
<223> Xaa é um resíduo aminoácido polar neutro ou ácido.
<220>
<221> características diversas
<222> (7, 15 e)..(16)
<223> Xaa é um resíduo aminoácido polar neutro.
<220>
<221> características diversas
<222> (8)..(8)
<223> Xaa é um resíduo aminoácido ácido.
<220>
<221> características diversas
<222> (10 e)..(11)
<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro.
<220>
<221> características diversas
<222> (18)..(18)
<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro ou básico.

<400> 74

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido acídico;

<220>

<221> características diversas

<222> (4).. (4)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro.

<220>

<221> características diversas

<222> (5)..(5)

<223> Xaa é F, D ou C.

<220>

<221> características diversas

<222> (10)..(10)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro.

<220>

<221> características diversas

<222> (13)..(13)

<223> Xaa é um resíduo ácido.

<400> 75

Cys Xaa Gly Xaa Xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys Xaa
1 5 10

<210> 76

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 76

Pro Ile Arg Gln Glu Glu Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Trp Glu Val
20

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 77

Thr Asn Ile Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
1 5 10 15

Met Pro Gly Lys
20

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 78

```

Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1      5      10      15
Met Ala Glu Val
      20

```

<210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 79

```

Asn Arg Leu Gln Glu Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1      5      10      15
Met Glu Asn Val
      20

```

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 80

```

Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1      5      10      15
Met Pro Arg Ser
      20

```

<210> 81

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 81

```

Leu Arg His Gln Glu Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1      5      10      15

```

```

Met Phe Asp Trp
      20

```

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 82

```

Val Pro Arg Gln Lys Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1      5      10      15

```

```

Met Tyr Val Gly
      20

```

<210> 83

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 83

Ser Ile Ser His Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gln Val Gly
 20

<210> 84

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 84

Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gly Arg Met
 20

<210> 85

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 85

Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gly Ser Thr
 20

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 86

Gly His Ser Gln Glu Glu Cys Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gly Thr Ser

20

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 87

Gln His Trp Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
 1 5 10 15

Met Pro Ser Lys
 20

<210> 88

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 88

Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Pro Val Arg
 20

<210> 89

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 89

Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His

1

5

10

15

Met Pro Arg Asn
20

<210> 90

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 90

Val Lys Thr Gln Glu His Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15Met Arg Glu Trp
20

<210> 91

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 91

Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Leu Pro Met
 20

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 92

Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Pro Pro Met
 20

<210> 93

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 93

Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15

Met Asp Ile Lys
 20

<210> 94

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 94

His	Gly	Gln	Asn	Met	Glu	Cys	Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His
1				5					10					15	
Met	Phe	Arg	Tyr												
			20												

<210> 95

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 95

Pro	Arg	Leu	Gln	Glu	Glu	Cys	Val	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His
1				5					10					15	
Met	Pro	Leu	Arg												
			20												

<210> 96

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 96

Arg	Thr	Thr	Gln	Glu	Lys	Cys	Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His
1				5					10					15	
Met	Glu	Ser	Gln												
			20												

<210> 97

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 97

```

Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
1      5      10      15
Met Val Ser Ser
                20

```

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 98

```

Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1      5      10      15
Leu Glu Gly Leu
                20

```

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 99

Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
 1 5 10 15

Met Val Gly Leu
 20

<210> 100

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 100

Leu Pro Gly Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Val Arg Ser
 20

<210> 101

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 101

Pro Met Asn Gln Val Glu Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Pro Arg Ser
 20

<210> 102

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

Phe Gly Trp Ser His Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Gly Ser Thr
20

$\langle 211 \rangle$ 20

<213> Sequência artificial

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met val Gly Pro

<211> 20

<213> Sequência artificial

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Asp Gln Leu
20

<210> 105

30 <211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 105

```

Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
1           5           10           15

```

```

Met Gln Val Asp
                20

```

<210> 106

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 106

```

Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu
1           5           10           15

```

```

Leu Gln Gly Trp
                20

```

<210> 107

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 107

Val	Leu	Gly	Gly	Gln	Gly	Cys	Gln	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Ser	His
1				5					10					15	

Leu	Glu	Asp	Gly
			20

<210> 108

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 108

Thr	Thr	Ile	Gly	Ser	Met	Cys	Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Ala	His
1				5					10					15	

Met	Gln	Gly	Gly
			20

<210> 109

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 109

Thr	Lys	Gly	Lys	Ser	Val	Cys	Gln	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Ser	His
1				5					10					15	

Met	Gln	Ser	Gly
			20

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 110

```

Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
1      5      10      15

```

```

Met Gln Gly Gly
1      20

```

<210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 111

```

Trp Val Asn Glu Val Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His
1      5      10      15

```

```

Trp Asp Thr Pro
1      20

```

<210> 112

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 112

```

Val Val Gln Val Gly Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His
1      5      10      15

```

```

Met Arg Leu Gln
1      20

```

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 113

Ala Val Gly Ser Gln Thr Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
1 5 10 15

Leu Val Glu Val
20

<210> 114

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 114

Gln Gly Met Lys Met Phe Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
1 5 10 15

Ile Val Tyr Arg
20

<210> 115

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 115

Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gln Gly Gly
 20

<210> 116

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 116

Thr Ser Gln Arg Val Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His
 1 5 10 15

Leu Thr Tyr Thr
 20

<210> 117

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 117

Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr
 1 5 10 15

Val Trp Pro Ser
 20

<210> 118

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 118

Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Phe	Cys	Gln	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Ser	His
1				5					10					15	
Met	Val	Gln	Gly												
				20											

<210> 119

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 119

Gln	Asn	Tyr	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Leu	Asp	Ala	Thr	Leu	Tyr	Glu	His
1				5					10					15	
Phe	Ile	Phe	His	Tyr	Thr										
						20									

<210> 120

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 120

Leu	Asn	Phe	Thr	Pro	Leu	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Thr	Leu	Tyr	Glu	Gln
1				5					10					15	
Trp	Thr	Leu	Gln	Gln	Ser										

<210> 121

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 121

Thr Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Gln
20

<210> 122

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 122

Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu His
1 5 10 15

Trp Met Phe Gln Gln Ala
20

<210> 123

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 123

Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Gln

1	5	10	15
Gln Thr Phe Gln Glu Arg			
	20		

<210> 124

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 124

Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15
Phe Ile Leu Gln Gln Gly
20

<210> 125

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 125

Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15
Trp Thr Leu Gln His Ala
20

<210> 126

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 126

```

Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1      5      10      15
Phe Met Leu Gln Gln Ala
20

```

<210> 127

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 127

```

Gln Asn Phe Lys Pro Met Asp Glu Leu Glu Asp Thr Leu Tyr Lys Gln
1      5      10      15
Phe Leu Phe Gln His Ser
20

```

<210> 128

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 128

Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Val
 20

<210> 129

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 129

Gln Glu Tyr Glu Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Thr Leu Tyr Asn Gln
 1 5 10 15

Trp Met Phe His Gln Arg
 20

<210> 130

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 130

Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Met Leu Gln His Gln
 20

<210> 131

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 131

```

Gln Lys Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Lys Thr Leu Tyr Asp Gln
1      5      10      15
Phe Met Leu Gln Gln Gly
                20

```

<210> 132

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 132

```

Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Lys Gln
1      5      10      15
Trp Thr Leu Gln Gln Arg
                20

```

<210> 133

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 133

```

Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Trp Leu Tyr His Gln
1      5      10      15
Phe Thr Leu His His Gln
                20

```

<210> 134

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 134

```

Gln Lys Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Gln
 1          5          10          15
Phe Met Phe Gln Gln Ser
          20

```

<210> 135

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 135

```

Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr Leu Tyr Glu Gln
 1          5          10          15
Trp Ile Arg Arg Tyr His
          20

```

<210> 136

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 136

Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Ile Leu Leu His Gly
 20

<210> 137

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 137

His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Tyr Gln
 1 5 10 15

Trp Leu Tyr Asp Gln Leu

20

<210> 138

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 138

Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Glu
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Gln His Ala
 20

<210> 139

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 139

```

Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His
1           5           10           15

```

```

Trp Ile Leu Gln His Ser
                20

```

<210> 140

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 140

```

Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln

```

```

1           5           10           15

```

```

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
                20

```

<210> 141

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 141

Thr Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
 20

<210> 142

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 142

Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
 20

<210> 143

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 143

Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr
 1 5 10 15

Asp Val Gln Ala
 20

<210> 144

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 144

Gln	Thr	Trp	Asp	Asp	Pro	Cys	Met	His	Ile	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Trp
1				5					10					15	
Arg	Arg	Cys	Ile												
			20												

<210> 145

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 145

Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Pro	Tyr	Asp	Gly	Met	Leu	Gly	Trp	Pro	Thr	Tyr
1				5					10					15	
Gln	Arg	Ile	Val												
			20												

<210> 146

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 146

Ser	Gly	Gln	Leu	Arg	Pro	Cys	Glu	Glu	Ile	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Gln
1				5					10					15	
Asn	Leu	Ala	Leu												
			20												

<210> 147

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 147

```

Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln
1      5      10      15
Leu Cys Pro Arg
                20

```

<210> 148

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 148

```

Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys
1      5      10      15
Asp Trp Tyr Gly
                20

```

<210> 149

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 149

Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Asp Lys Gln Thr
 20

<210> 150

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 150

Lys Leu Glu Tyr Cys Asp Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Gln Gly Cys
 1 5 10 15

Asp Asn Gln Ser
 20

<210> 151

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 151

Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Arg
 20

<210> 152

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 152

Ala	Gln	Asp	Tyr	Cys	Glu	Gly	Met	Glu	Asp	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Cys
1				5				10						15	
Glu	Met	Gln	Lys												
			20												

<210> 153

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 153

Leu	Leu	Asp	Tyr	Cys	Glu	Gly	Val	Gln	Asp	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Cys
1				5				10						15	
Glu	Asn	Leu	Asp												
			20												

<210> 154

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 154

His	Gln	Glu	Tyr	Cys	Glu	Gly	Met	Glu	Asp	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Cys
1				5				10						15	
Glu	Tyr	Gln	Gly												

<210> 155
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2
 <400> 155

Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Asp Lys Gln Met
 20

<210> 156
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2
 <400> 156

Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Asn Gln Arg
 20

<210> 157
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2
 <400> 157

Leu Glu Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys

1

5

10

15

Glu Lys Glu Arg
20

<210> 158

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (1)..(1)

<223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico.

<220>

<221> características diversas

<222> (2,4, 14)..(19)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro.

<220>

<221> características diversas

<222> (3, 6)..(17)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido ácido.

<220>

<221> características diversas

<222> (8)..(8)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro.

<220>

<221> características diversas

<222> (9)..(9)

<223> Xaa é E, D ou Q.

<220>

<221> características diversas

<222> (18)..(18)

<223> Xaa é um resíduo aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico.

<220>

<221> características diversas

<222> (20)..(20)

<223> Xaa está ausente ou é um resíduo aminoácido.

<400> 158

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
20

<210> 159

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 159

ccgacccgc aggaagatg cgactggac cgtggacct gcgaacacat gagggaagt 60

<210> 160

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 160

ecceacatcc aggaagaatg cgaatgggac cgtggacct ggaaccacat ggcgggtaaa 60

<210> 161

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 161

tggtacgac aggaagcttg cgaatgggac cgtggacct ggaaccacat ggtgaagt 60

<210> 162

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 162

aacctctgc aggaagttg cgaatgggac cgtggacct ggaaccacat ggaaacgt 60

<210> 163

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 163

gtgtctacc aggaagattg cgaatgggac ccgtggacct ggaacacat gacggtacc 60

<210> 164

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 164

ctggttcacc aggaaggttg cgaatgggac ccgtggacct ggaacacat gttcgactgg 60

<210> 165

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 165

gttcgtgcgc agaaagacig cgaatgggac ccgtggacct ggaacacat gtacgttggc 60

<210> 166

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 166

tgggtgctc aggaagaaag cgaatgggat ccgtggactt ggaacacat gggtgtag 60

<210> 167

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 167

acttgggcgc aggaacaaag cgaatgggat ccgtggactt ggaacacat gggtctact 60

<210> 168

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 168

ggtaactccc aggaagaaag cgaatgggat ccgtggactt ggaacacat gggtactcc 60

<210> 169

<211> 60

<212> ADN

<213> Artificial sequence

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 169

caaacatggc aggaagaaag cgaatgggat ccgtggactt ggaacacat gggtacaa 60

<210> 170

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 170

aaacttcgtc aggaataaatg cgaatgggac cctgggacct ggaacacat gcgggttcgt 60

<210> 171

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 171

aaatccgttc aggttgaaatg caactgggac cctgggacct ggaacacat gcgcggtaac 60

<210> 172

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 172

gttaaaacc aggaacactg caactgggac cctgggacct ggaacacat gcggaatgg 60

<210> 173

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 173

gcttggggtc aggaagggtg cgaatgggac ccgtggacct gcaacacat gctgccgatg 60

<210> 174

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 174

ccgttsacc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcaacacat gccgacgatg 60

<210> 175

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 175

cgtgtccgc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgtcacat ggacacaaa 60

<210> 176

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 176

cacggctcaga acatgggaatg cgaatgggac ccgtggacct gogaacacat gtccggtac 60

<210> 177

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 177

cgcgctctgc aggaagaatg cgttgggac ccgtggacct gogaacacat gccgctgcgt 60

<210> 178

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 178

cgtaccaccc aggaagaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggaatccag 60

<210> 179

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 179

cagaccctcc aggaagactg cgttgggac ccgtggacct ggaaccacat gggtccctcc 60

<210> 180

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 180

caggatctg gtgtccgtg cgaatgggac ccgtggacct ggaaccacat ggaaggctg 60

<210> 181

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 181

tgggtcagc aggaagactg cgttgggac ccgtggacct ggaaccacat gggtggctg 60

<210> 182

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 182

cgcacgggac aggaagacag cgaatgggac ccgaggacct ggaacacat ggtagctcc 60

<210> 183

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 183

ccggaacac aggtgaatg cgaatgggac ccgaggacct ggaacacat gccgcgtcc 60

<210> 184

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 184

ttcgttggc ctacgggtg cgaatgggac ccgaggacct ggaacacat gggctacc 60

<210> 185

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 185

~~aaatccaccc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gagaacacat ggctgggaccg~~ 60

<210> 186

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 186

~~ggcccgctg tctccactg ccagtgggac ccgtggacct ggaacacat ggaccagctg~~ 60

<210> 187

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 187

~~tccaccatg gtacatgtg cgaatgggac ccgtggacct ggcacacat gcaagtgac~~ 60

<210> 188

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 188

gtctgggtg gtcagggttg cgaatgggac ccgtggacct gcctctgct gcaagggttg 60

<210> 189

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 189

gtctgggtg gtcagggttg ccagtgggac ccgtggacct gctccacct ggaagtcgtt 60

<210> 190

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 190

accacatcg gtccatgtg ccagtgggac ccgtggacct gcctccacct gcagggtgtt 60

<210> 191

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 191

cccaaggta aatccgttg ccagtgggac ccgtggacct gctccacct gcagtcgtt 60

<210> 192

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 192

accaccatgg gttccatgtg ccagtgaggac ccgaggacct gggctccact gcagggttgt 60

<210> 193

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 193

tgggttsacg aagttgttg cgsatgggac ccgtggacct gcaaacactg ggcacccccc 60

<210> 194

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 194

gtgttcagg ttggatgtg ccagtgaggac ccgtggacct gcaaacacat ggctctgcag 60

<210> 195

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 195

gcctgttggtl cccagaccctg cgaatgggac cctgggaact gcgcacact ggtagaagt 60

<210> 196

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 196

cagggtatga aaatgtctg cgaatgggac cctgggaact gcgcacact cgttaacgt 60

<210> 197

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 197

accacacatg gttccatgtg ccagtgggac cctgggaact gcgaacacat gcaggggtgt 60

<210> 198

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 198

acotccagc gctgtgtg cgaatggac cctggacct gccagacct gacctaac 60

<210> 199

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 199

cagtgacct ggccgcctg cgaatggac cctggacct gccagacct tggccgtac 60

<210> 200

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 200

ggtaacccc cgtcttcg ccagtggaac cctggacct gctccaca: ggtcaggt 60

<210> 201

<211> 42

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 201

caggagagat gggaaigggg ccatggact tggacacaca ig 42

<210> 202

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 202

cagaactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactt catcttccac 60

tacacc 66

<210> 203

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 203

ctgaacttca ccccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60

cagtc 66

<210> 204

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 204

```
accaaattca acccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag    60
caccag                                     66
```

<210> 205

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 205

```
gttaaattca aaccgctgga cgctctggaa cagaccctgt acgaacactg gatgttccag    60
caggt                                     66
```

<210> 206

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 206

```
gttaaataca aaccgctgga cgaactggac gaaatcctgt acgaacagca gaccttccag    60
gaacgt                                     66
```

<210> 207

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 207

```

accaacttca tgcgatgga cgacctggaa cagcgtctgt acgaacagtt catcctgcag    60
cagggt                                         66

```

<210> 208

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 208

```

tccaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gacctgcag    60
cacgct                                         66

```

<210> 209

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 209

```

cagaaattcc agccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag    60
caggct                                         66

```

<210> 210

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 210

```
cagaacttca aaccgatgga cgaattggaa gacaccctgt acaaacagtt cctgttccag    60
cactcc                                           66
```

<210> 211

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 211

```
tacaaattca ccccgctgga cgacctggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag    60
cacgtt                                           66
```

<210> 212

<211> 65

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 212

```
aggaatacga accgctggac gaactggacg aaaccctgta caaccagtg atgttccacc    60
agcgt                                           65
```

<210> 213

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 213

```
tccaacttca tgccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag    60
caccag                                         66
```

<210> 214

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 214

```
cagaaatacc agccgctgga cgaactggac aaaaccctgt acgatcagtt catgctgcag    60
caggggt                                         66
```

<210> 215

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 215

```
cagaaattcc agccgctgga cgaactggaa gaaaccctgt acaaacagtg gaccctgcag    60
cagcgt                                         66
```

<210> 216

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 216

```
gttaaataca aaccgctgga cgaactggac gaatggctgt accaccagtt caccctgcac    60
caccag                                           66
```

<210> 217

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 217

```
cagaaattca tgccgctgga cgaactggac gaaatcctgt acgaacagtt catgttccag    60
cagtcac                                           67
```

<210> 218

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 218

cagaccttcc agccgctgga cgacctggaa gaatacttgt acgaacagtg gatccgtcgt 60
taccac 66

<210> 219

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 219

gaagactaca tgccgctgga cgctctggac gctcagctgt acgaacagtt catcctgctg 60
cacggt 66

<210> 220

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 220

cacaccttcc agccgctgga cgaactggaa gaaacctgt actaccagtg gctgtacgac 60
cagctg 66

<210> 221

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 221

```
tacaaattca acccgatgga cgaactggaa cagaccctgt acgaagaatt cctgttccag    60
cacgct                                         66
```

<210> 222

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 222

```
accaactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactg gatcctgcag    60
cactcc                                         66
```

<210> 223

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 223

```
cagaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag    60
cagcgt                                         66
```

<210> 224

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 224

```

accaaattcc agccgctgga cgaactggac cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag      60
cagcgt                                     66

```

<210> 225

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 225

```

accaacttcc agccgctgga cgaactggac cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag      60
cagcgt                                     66

```

<210> 226

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 226

```

aaattcaacc cgtggacga gcgggaagag actctgtacg aacagttac tticaacag      60

```

<210> 227

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 227

gtctgggga tgggtccga cgaaggatg ctgggtggc cgaactaca ggtcaggat 60

<210> 228

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 228

cagacttggg aagatccgtg catgcacatt ctgggtccgg ttactggcg tcttgcatac 60

<210> 229

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 229

gtctccggga aggttcgga cgaaggatg ctgggtggc cgaactaca ggtcaggat 60

<210> 230

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 230

tcgggcagc tgcgtccgtg cgaagcaatc ttgggtggc gtaccacaga cctggctcgt 60

<210> 231

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 231

ttggggaca aacgtccgct ggaatgcata ttgggtggtc cgaaccagct gtgcccgcgt 60

<210> 232

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 232

ggcagggacc tgcgtccgtg cgaagacatg ttgggtggtc gtaccacaga ctggtacggt 60

<210> 233

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 233

gggttgaat actgcgacgg tatggaagac ccgttcaact tgggtgcga caaacagacc 60

<210> 234

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 234

aaactggat actgcgacgg tatggaagac ccgttcaacc aggttgcga caaccagtc 60

<210> 235

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 235

cgcaggat gggtgcgagg tatggaagac ccgttcaact tgggtgcga caaacagcgt 60

<210> 236

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 236

gctcaggact actgcgaagg tatggagagac ccgttcacct tgggtgcga aatgcagaaa 60

<210> 237

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 237

cgtcaggact actgcgaagg tctcaggac ccgttcacct tgggtgcga aacccaggac 60

<210> 238

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 238

caccaggact actgcgaagg tatggagac ccgttcacct tgggtgcga ataccagggt 60

<210> 239

<211> 60

<212> ADN

<213> Articial sequence

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 239

ctgcaggact actgcgaagg tatggagac ccgttcacct tgggtgcga caaacagatg 60

<210> 240

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 240

ctgcaggact actgcgaagg tctgaagac ccgtccact tcggttgcg aaacacagct 60

<210> 241

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 241

ctgcaggact actgcgaagg tctgaagac ccgtccact tcggttgcg aaacacagct 60

<210> 242

<211> 54

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido que é capaz de se ligar a Ang-2

<400> 242

tccactact gccaagggtg tgaagcccg tccacttgc gctgtgataa ccac 54

<210> 243

<211> 250

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica péptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 243

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

85

90

95

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

<210> 244

<211> 29

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 244

caaacgaatg gatactcatc aaagacaga 28

<210> 245

<211> 42

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucloetido

<400> 245

gggggtggcgc ccgcactcga gactgttgaa agttgttag ca 42

<210> 246

<211> 29

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 246

caaacgaatg gatccatcatt aaagccaga 29

<210> 247

<211> 43

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 247

aaacacaaaag tgcacagggc ggaagtgatc gtcagccgc act 43

<210> 248

<211> 91

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 248

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn

20

25

30

Lys Asn Asn Lys Ser Ala Arg Thr Gly Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly
 35 40 45

Thr Gly Gly Ala Ser Cys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn
 50 55 60

Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala
 85 90

<210> 249

<211> 91

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 249

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Ala Ala Lys Cys Gly Lys Cys Cys
 20 25 30
 Lys Asn Asn Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Ala Thr Lys Thr Thr Lys
 35 40 45
 Gly Gly Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Ala Cys Lys Thr Ala Lys Cys
 50 55 60
 Ala Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80
 Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala
 85 90

<210> 250

<211> 95

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 250

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr
 20 25 30
 Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys
 35 40 45
 Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr
 50 55 60
 Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn
 65 70 75 80
 Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 85 90 95

<210> 251

<211> 91

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 251

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Lys Gly Ala Lys Gly Ala
 20 25 30

Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Thr Gly Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys
 35 40 45

Thr Gly Lys Ala Cys Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Ala
 50 55 60

Thr Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala

85

90

<210> 252

55 <211> 89

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 252

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Thr Thr Lys Gly Ala Lys Thr Ala Lys Asn Asn Lys Gly Ala
 20 25 30
 Lys Gly Gly Lys Gly Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys
 35 40 45
 Thr Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Gly
 50 55 60
 Ala Lys Ala Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80
 Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 85

<210> 253

<211> 95

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 253

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr
 20 25 30
 Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys
 35 40 45
 Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr
 50 55 60
 Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn
 65 70 75 80
 Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 85 90 95

<210> 254
<211> 15
<212> ADN
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Oligonucleótido
<400> 254
cacagtgcac agggg 15

<210> 255
<211> 16
<212> ADN
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Oligonucleótido
<400> 255
tgaatcggag agaatg 16

<210> 256
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Oligonucleótido
<400> 256
gttagctcac tctataggca c 21

<210> 257
<211> 21
<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 257

gtaccgtaac actgagttc g 21

<210> 258

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 258

ttacacttta tgcctccg 18

<210> 259

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 259

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Ile Arg Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Trp Glu Val Leu Glu

<210> 260

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 260

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Ile Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Gly Lys Leu Glu
20 25 30

<210> 261

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 261

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Ala Glu Val Leu Glu

20

25

30

<210> 262

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 262

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Asn	Arg	Leu	Gln	Glu	Val	Cys
1				5					10					15	

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His	Met	Glu	Asn	Val	Leu	Glu
			20					25					30	

<210> 263

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 263

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu

20

25

30

<210> 264

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 264

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Arg His Gln Glu Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Asp Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 265

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 265

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Pro Arg Gln Lys Asp Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Tyr Val Gly Leu Glu

20

25

30

<210> 266

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 266

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Ile Ser His Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gln Val Gly Leu Glu
20 25 30

<210> 267

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 267

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Arg Met Leu Glu

20

25

30

<210> 268

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 268

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu
20 25 30

<210> 269

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 269

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly His Ser Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Thr Ser Leu Glu

20

25

30

<210> 270

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 270

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln His Trp Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Ser Lys Leu Glu
20 25 30

<210> 271

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 271

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys
1          5          10          15
```

```
Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Val Arg Leu Glu
```

20

25

30

<210> 272

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 272

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys
1          5          10          15
```

```
Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Asn Leu Glu
20          25          30
```

<210> 273

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 273

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Lys Thr Gln Glu His Cys
1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Arg Glu Trp Leu Glu

20

25

30

<210> 274

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 274

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys
1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Pro Met Leu Glu
20 25 30

<210> 275

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 275

Met xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Pro Met Leu Glu

20

25

30

<210> 276

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 276

Met xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Asp Ile Lys Leu Glu
20 25 30

<210> 277

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 277

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gly Gln Asn Met Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Arg Tyr Leu Glu

20

25

30

<210> 278

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 278

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Leu Arg Leu Glu
20 25 30

<210> 279

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 279

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys
 1          5          10          15
```

```
Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Ser Gln Leu Glu
```

20

25

30

<210> 280

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 280

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys
 1          5          10          15
```

```
Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Ser Ser Leu Glu
      20          25          30
```

<210> 281

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 281

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Leu Glu Gly Leu Leu Glu

20

25

30

<210> 282

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 282

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Gly Leu Leu Glu
20 25 30

<210> 283

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 283

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Leu	Pro	Gly	Gln	Glu	Asp	Cys
1			5						10					15	

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His	Met	Val	Arg	Ser	Leu	Glu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

25

30

<210> 284

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 284

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Met Asn Gln Val Glu Cys
 1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu
 20 25 30

<210> 285

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 285

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu

20

25

30

<210> 286

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 286

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys
 1          5          10          15
Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Val Gly Pro Leu Glu
          20          25          30

```

<210> 287

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 287

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys
 1          5          10          15
Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Asp Gln Leu Leu Glu
          20          25          30

```

<210> 288

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 288

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys
 1          5          10          15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Val Asp Leu Glu
 20          25          30

```

<210> 289

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 289

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys
 1          5          10          15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu

```

20

25

30

<210> 290

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2).. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 290

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys
1      5      10      15
```

```
Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Leu Glu Asp Gly Leu Glu
      20      25      30
```

<210> 291

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 291

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
1      5      10      15
```

```
Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu
```

20

25

30

<210> 292

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 292

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Lys Gly Lys Ser Val Cys
 1          5          10          15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Met Gln Ser Gly Leu Glu
      20          25          30

```

<210> 293

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 293

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
 1          5          10          15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu
      20          25          30

```

<210> 294

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 294

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Trp	Val	Asn	Glu	Val	Val	Cys
1			5					10					15		
Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Asn	His	Trp	Asp	Thr	Pro	Leu	Glu	
			20				25						30		

<210> 295

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 295

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Val	Val	Gln	Val	Gly	Met	Cys
1			5					10					15		
Gln	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Lys	His	Met	Arg	Leu	Gln	Leu	Glu	

20

25

30

<210> 296

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 296

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Val Gly Ser Gln Thr Cys
 1          5          10          15
```

```
Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Leu Val Glu Val Leu Glu
      20          25          30
```

<210> 297

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 297

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Gly Met Lys Met Phe Cys
 1          5          10          15
```

```
Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Ile Val Tyr Arg Leu Glu
```

20

25

30

<210> 298

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 298

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Thr	Ile	Gly	Ser	Met	Cys
1				5				10					15	
Gln	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His	Met	Gln	Gly	Gly	Leu	Glu
			20					25					30	

<210> 299
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 299

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Val	Gly	Cys
1				5				10					15	
Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Gln	His	Leu	Thr	Tyr	Thr	Leu	Glu

<210> 300

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 300

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Gln	Trp	Ser	Trp	Pro	Pro	Cys
1				5					10					15	

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Gln	Thr	Val	Trp	Pro	Ser	Leu	Glu
		20					25						30	

<210> 301

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 301

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Phe	Cys
1				5					10					15	

Gln	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Ser	His	Met	Val	Gln	Gly	Leu	Glu

<210> 302

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 302

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Gly Leu His Gln Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys Val Leu Trp Pro Ser Leu Glu
20 25 30

<210> 303

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 303

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Trp Arg Ser Gln Val Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn Leu Gly Gly Asp Trp Leu Glu

20

25

30

<210> 304

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 304

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Phe Phe Tyr Gly Ala Leu Glu
 20 25 30

<210> 305

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 305

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Thr Phe Ala Arg Gln Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala Leu Gly Gly Asn Trp Leu Glu

20

25

30

<210> 306

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 306

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu Pro Leu Pro Leu Met Leu Glu
 20 25 30

<210> 307

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 307

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Pro Glu Asp Met Cys Ser
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Trp His Leu Gln Gly Tyr Cys Leu Glu

20

25

30

<210> 308

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 308

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Trp Gln Leu Ala Val Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Gln Thr Cys Asp His Met Gly Ala Leu Leu Glu
20 25 30

<210> 309

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 309

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Leu Val Ser Leu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Asp Gly Trp Leu Glu

20

25

30

<210> 310

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 310

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Gly Gly Ala Gly Arg Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
20 25 30

<210> 311

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 311

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Phe Leu Pro Asn Glu Cys
1      5      10      15
```

```
Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser Asn Leu Pro Glu Ala Leu Glu
```

20

25

30

<210> 312

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 312

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Gly Cys
1      5      10      15
```

```
Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
20      25      30
```

<210> 313

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 313

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Pro Gln Thr Glu Gly Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu His Gly Trp Leu Glu

20

25

30

<210> 314

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2).. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 314

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Asp Thr Arg Gln Gly Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Tyr Gly Met Trp Leu Glu
20 25 30

<210> 315

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 315

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu

20

25

30

<210> 316

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 316

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
20 25 30

<210> 317

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 317

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu

20

25

30

<210> 318

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 318

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly xaa

<210> 319

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 319

Met Gly Ala Gln Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr

1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Trp Ile Leu Gln His Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly xaa

<210> 320

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 320

```

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

Leu Tyr Asp Gln Phe Met Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20          25          30

Gly Xaa

```

<210> 321

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 321

```

Met Gly Ala Gln Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
1          5          10          15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20          25          30

Gly Xaa

```

<210> 322

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 322

```

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
1      5      10      15
Leu Tyr Glu Gln Phe Met Leu Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20      25      30
Gly Xaa

```

<210> 323

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 323

```

Met Gly Ala Gln Gln Glu Tyr Glu Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Thr
1      5      10      15
Leu Tyr Asn Gln Trp Met Phe His Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20      25      30
Gly Xaa

```


<210> 324

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 324

```
Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile
 1           5           10           15
```

```
Leu Tyr Glu Gln Gln Thr Phe Gln Glu Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
      20           25           30
```

Gly Xaa

<210> 325

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 325

Met Gly Ala Gln Thr Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 326

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 326

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 327

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 327

Met	Gly	Ala	Gln	Gln	Asn	Phe	Lys	Pro	Met	Asp	Glu	Leu	Glu	Asp	Thr
1				5					10					15	

Leu	Tyr	Lys	Gln	Phe	Leu	Phe	Gln	His	Ser	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly
			20				25						30		

Gly Xaa

<210> 328

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 328

Met	Gly	Ala	Gln	Val	Lys	Tyr	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Leu	Asp	Glu	Trp
1				5					10					15	

Leu	Tyr	His	Gln	Phe	Thr	Leu	His	His	Gln	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly
			20				25						30		

Gly Xaa

<210> 329

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 329

Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr
1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Val Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 330

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 330

Met Gly Ala Gln Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr
1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Phe Ile Phe His Tyr Thr Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 331

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 331

Met Gly Ala Gln Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr
1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Trp Met Phe Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 332

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 332

Met Gly Ala Gln Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Leu His Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 333

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 333

Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Phe Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 334

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 334

Met Gly Ala Gln Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Met Leu Gln His Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 335

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 335

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
1 5 10 15

Leu Tyr Lys Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 336

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 336

```

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile
1          5          10          15

Leu Tyr Glu Gln Phe Met Phe Gln Gln Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20          25          30

Gly Xaa

```

<210> 337

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 337

```

Met Gly Ala Gln Thr Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
1          5          10          15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20          25          30

Gly Xaa

```

<210> 338

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 338

```
Met Gly Ala Gln His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
1           5           10           15
```

```
Leu Tyr Tyr Gln Trp Leu Tyr Asp Gln Leu Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20           25           30
```

Gly Xaa

<210> 339

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 339

```
Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
1           5           10           15
```

```
Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20           25           30
```

Gly Xaa

<210> 340

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 340

Met Gly Ala Gln Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Ile Arg Arg Tyr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 341

<211> 34

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 341

Met Gly Ala Gln Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 342

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 342

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys

1 5 10 15

Glu Glu Ile Phe Gly Cys Gly Thr Gln Asn Leu Ala Leu Leu Glu
 20 25 30

<210> 343

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 343

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr
 1           5           10           15

Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr Asp Val Gln Ala Leu Glu
      20           25           30

```

<210> 344

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 344

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys
      1           5           10           15

Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys Asp Trp Tyr Gly Leu Glu
      20           25           30

```

<210> 345

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 345

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr
 1          5          10          15
```

```
Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr Gln Arg Ile Val Leu Glu
          20          25          30
```

<210> 346

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 346

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys
```

```
1          5          10          15
```

```
Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp Arg Arg Cys Ile Leu Glu
          20          25          30
```

<210> 347

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

$\langle 220 \rangle$

<221> características diversas

$$\langle 222 \rangle \quad (2) \cdot \cdot (2)$$
$$\langle 223 \rangle \quad X_{aa} = F_C$$

<400> 347

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu
1 5 10 15

Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln Leu Cys Pro Arg Leu Glu
20 25 30

<210> 348

<211> 25

<212> PRT

<213> Sequência artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

 $\langle 220 \rangle$

<221> características diversas

 $\langle 222 \rangle \quad (2) \cdot \cdot (2)$
$$\langle 223 \rangle \quad X_{aa} = F_C$$

$\langle 400 \rangle$ 348

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile

1	5	10	15
1	1	1	1
2	2	3	4
3	3	6	10
4	4	10	20
5	5	15	35
6	6	21	62
7	7	28	119
8	8	36	224
9	9	45	429
10	10	55	858
11	11	66	1716
12	12	78	3543
13	13	91	7371
14	14	105	15184
15	15	120	31500
16	16	136	65536
17	17	153	139839
18	18	171	300360
19	19	190	649560
20	20	210	1456000
21	21	231	3243210
22	22	253	7254600
23	23	276	16215180
24	24	300	36324000
25	25	325	81256250
26	26	351	182700000
27	27	378	411265500
28	28	406	921625600
29	29	435	2079456000
30	30	465	4714350000
31	31	496	10618560000
32	32	528	23900160000
33	33	561	54016440000
34	34	595	122163840000
35	35	630	277335000000
36	36	666	623212800000
37	37	703	1419840000000
38	38	741	3221760000000
39	39	780	7311600000000
40	40	820	16472000000000
41	41	861	37216800000000
42	42	903	84128000000000
43	43	946	190166400000000
44	44	990	429216000000000
45	45	1035	972480000000000
46	46	1081	2201600000000000
47	47	1128	4966400000000000
48	48	1176	11200000000000000
49	49	1225	25200000000000000
50	50	1275	56700000000000000
51	51	1326	127680000000000000
52	52	1378	288240000000000000
53	53	1431	651840000000000000
54	54	1485	1474560000000000000
55	55	1540	3331200000000000000
56	56	1596	7507200000000000000
57	57	1653	16838400000000000000
58	58	1711	37920000000000000000
59	59	1770	85440000000000000000
60	60	1830	192000000000000000000
61	61	1891	432000000000000000000
62	62	1953	972000000000000000000
63	63	2016	2184000000000000000000
64	64	2080	4928000000000000000000
65	65	2145	11104000000000000000000
66	66	2211	24960000000000000000000
67	67	2278	56240000000000000000000
68	68	2346	126080000000000000000000
69	69	2415	284160000000000000000000
70	70	2485	638400000000000000000000
71	71	2556	1440000000000000000000000
72	72	2628	3225600000000000000000000
73	73	2701	7257600000000000000000000
74	74	2775	16320000000000000000000000
75	75	2850	36576000000000000000000000
76	76	2926	82080000000000000000000000
77	77	3003	184320000000000000000000000
78	78	3081	414720000000000000000000000
79	79</		

Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln Leu Glu
20 25

<210> 349

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 349

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly
 1          5          10          15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu
          20          25          30

```

<210> 350

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptidorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 350

```

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly
          5          10          15

Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Met Leu Glu
          20          25          30

```

<210> 351

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 351

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gln Glu Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Tyr Gln Gly Leu Glu
20 25 30

<210> 352

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 352

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Gln Arg Leu Glu
20 25 30

<210> 353

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 353

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Leu Asp Tyr Cys Glu Gly
 1           5           10           15
```

```
Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Leu Asp Leu Glu
      20           25           30
```

<210> 354

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 354

```
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly
```

```
1           5           10           15
```

```
Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Thr Leu Glu
      20           25           30
```

<210> 355

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 355

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gln Asp Tyr Cys Glu Gly
 1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Met Gln Lys Leu Glu
 20 25 30

<210> 356

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 356

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly

1 5 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu
 20 25 30

<210> 357

<211> 31

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 357

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Lys	Leu	Glu	Tyr	Cys	Asp	Gly
1			5						10					15	

Met	Glu	Asp	Pro	Phe	Thr	Gln	Gly	Cys	Asp	Asn	Gln	Ser	Leu	Glu
		20						25					30	

<210> 358

<211> 29

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptícorpos capazes de se ligarem a Ang-2

<220>

<221> características diversas

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 358

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val

1 5 10 15

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Asn His Leu Glu
20 25

<210> 359

<211> 32

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de se ligar a Ang-2

<400> 359

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp
1 5 10 15

Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu
20 25 30

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pelo requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- US 32862401 P [0001]
- US 6166185 A [0009] [0046]
- US 5650490 A [0009]
- US 5814464 A [0009]
- WO 0024782 A [0010] [0059] [0283] [0284] [0286]
- US 5480981 A [0011]
- US 5808029 A [0011]
- WO 9723614 A [0011]
- US 9723183 W [0011]
- WO 9521258 A [0011]
- WO 0057901 A [0012]
- US 4289872 A, Denkenwalter [0067]
- US 5229490 A, Tam [0067]
- WO 9321259 A, Frechet [0067]
- US 5223409 A [0074]
- US 5733731 A [0074]
- US 5498530 A [0074]
- US 5432018 A [0074]
- US 5338665 A [0074]
- US 5922545 A [0074]

- WO 9640987 A [0074]
- WO 9815833 A [0074]
- WO 9734631 A [0084]
- WO 9632478 A [0084]
- US 5739277 A, Presta [0085]
- WO 9611953 A [0086] [0089]
- WO 9605309 A [0089]
- EP 0315456 A [0089]
- US 5877289 A [0099]
- US 6004555 A [0099]
- US 6132729 A [0099]
- US 6132730 A [0099]
- US 6156321 A [0099]
- EP 0988056 A [0099]
- US 3969287 A [0134] [0150]
- US 3691016 A [0134] [0150]
- US 4195128 A [0134] [0150]
- US 4247642 A [0134] [0150]
- US 4229537 A [0134] [0150]
- US 4330440 A [0134] [0150]
- US 4640835 A [0142]
- US 4496689 A [0142]
- US 4301144 A [0142]
- US 4670417 A [0142]
- US 4791192 A [0142]
- US 4179337 A [0142]
- US 6133426 A, Gonzales [0142]
- US 3817837 A [0156] [0156]
- US 3850752 A [0156] [0156]
- US 3996345 A [0156] [0156]
- US 4277437 A [0156]

- US 3939350 A [0156]
- US 5424398 A [0157]
- US 61715868, Lam [0214]
- US 941001575 W [0222]
- US 9300829 W [0229]
- US 3773919 A [0229]
- EP 58481 A [0229]
- EP 133988 A [0229]
- EP 36676 A [0229]
- EP 88046 A [0229]
- EP 143949 A [0229]
- WO 9839027 A [0246]
- US 4710473 A [0283]
- US 60414155 B [0377]
- US 60328624 B [0377]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- Folkman, J. *Nat. Med.*, 1995, vol. 1, 27-31 [0003]
- Gale, N. W.; Yancopoulos, G. D. *Genes Dev.*, 1999, vol. 13, 1055-1066 [0005]
- Davis, S. *et al.* *Cell*, 1996, vol. 87, 1161-1169 [0005]
- Grosios, K. *et al.* *Cytogenet Cell Genet*, 1999, vol. 84, 118-120 [0005]
- Holash, J. *et al.* *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1999, vol. 42, 1617-1625 [0005]
- Koblizek, T. I. *et al.* *Current Biology*, 1998, vol. 8, 529-532 [0005]
- Lin, P. *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, 8829-8834 [0005]

- **Maisonpierre, P.C. et al.** *Science*, 1997, vol. 277, 55-60 [0005]
- **Papapetropoulos, A. et al.** *Lab Invest* 1999, vol. 79, 213-223 [0005]
- **Sato, T. N. et al.** *Nature*, 1998, vol. 375, 70-74 [0005]
- **Shyu, K. G. et al.** *Circulation*, 1998, vol. 98, 2081-2087 [0005]
- **Sun, C. et al.** *Cell*, 1996, vol. 87, 1171-1180 [0005]
- **Sun, C. et al.** *Science*, 1998, vol. 282, 468-471 [0005]
- **Valenzuela, D. M. et al.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1999, vol. 96, 1904-1909 [0005]
- **Witzenbichler, B. et al.** *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, 18514-18521 [0005]
- **J.H. Kim et al.** *Oncogene*, 2000, vol. 19 (39), 4549-4552 [0005]
- **K., P.C. Maisonpierre et al.** *Cardiovascular Research*, 2001, vol. 49 (3), 659-70 [0005]
- **Dumont, O. J. et al.** *Genes & Development*, 1994, vol. 8, 1897-1909 [0006]
- **Sato, T. N. et al.** *Nature*, 1995, vol.376, 70-74 [0006]
- **Hanahan, O.** *Science*, 1997, vol. 277, 48-50 [0006]
- **Zagzag, D. et al.** *Experimental Neurology*, 1999, vol. 159, 391-400 [0006]
- **Holash, J. et al.** *Science*, 1999, vol. 284, 1994-1998 [0006]
- **Bunone, G. et al.** *American Journal of Pathology*, 1999, vol. 155, 1967-1976 [0007]
- **Etoh, T. et al.** *Cancer Research*, 2001, vol. 61, 2145-2153 [0007]

- **Hangai, M. et al.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2001, vol. 42, 1617-1625 [0007]
- **Kuroda, K. et al.** *Journal of Investigative Dermatology*, 2001, vol. 116, 713-720 [0007]
- **Otani, A. et al.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1999, vol. 40, 1912-1920 [0007]
- **Stratmann, A. et al.** *American Journal of Pathology*, 1998, vol. 153, 1459-1466 [0007]
- **Tanaka, S. et al.** *J Clin Invest*, 1999, vol. 103, 34-345 [0007]
- **Yoshida, Y. et al.** *International Journal of Oncology*, 1999, vol. 15, 1221-1225 [0007]
- **Yuan, K. et al.** *Journal of Periodontal Research*, 2000, vol. 35, 165-171 [0007]
- **Mezquita, J. et al.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, vol. 260, 492-498 [0007]
- **Ahmad et al.** *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, 1255-1259 [0008]
- **Yu et al.** *Am. J. Path.*, 2001, vol.158, 563-570 [0008]
- **Lin et al.** *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, 8829-8834 [0009]
- **Lin et al.** *J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 100, 2072-2078 [0009]
- **Sienieister et al.** *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 3185-3189 [0009]
- **Zheng et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 154, 5590-5600 [0011]
- **Fisher et al.** *N. Engl. J. Med.*, 1996, vol. 334, 1697-1702 [0011]
- **Van Zee, K. et al.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 156, 2221-2230 [0011]
- **Capon et al.** *Nature*, 1989, vol. 337, 525-531 [0011]
- **Harvill et al.** *Immunotech.*, 1995, vol. 1, 95-105 [0011]

- **Linsley.** *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 174, 561-569 [0011]
- **Suzuki, D.** *An Introduction to Genetic Analysis.* W.H. Freeman Pub. Co, 1986 [0035]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0044]
- **Ellison et al.** *Nucl. Acids. Res.*, 1982, vol. 10, 4071-9 [0063]
- **Clackson et al.** *Science*, 1995, vol. 267, 383-6 [0073]
- **Scott et al.** *Science*, 1990, vol. 249, 386 [0074]
- **Devlin et al.** *Science*, 1990, vol. 249, 404 [0074]
- **Cwirla et al.** *Science*, 1997, vol. 276, 1696-9 [0074]
- **Lowman.** *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1997, vol. 26, 401-24 [0074]
- **Takasaki et al.** *Nature Biotech*, 1997, vol. 15, 1266-70 [0075]
- **Roberts Szostak.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 12297-303 [0076]
- **Wells Lowman.** *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1992, vol. 3, 355-62 [0076]
- **Cortese et al.** *Curr. Opin. Biotech.*, 1996, vol. 7, 616-21 [0077]
- **Kreeger.** *The Scientist*, 1996, vol. 10 (13), 19-20 [0077]
- **Dedman et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 23025-30 [0080]
- **Bhatnagar et al.** *J. Med. Chem.*, 1996, vol. 39, 3814-9 [0081]
- **Cuthbertson et al.** *J. Med. Chem.*, 1997, vol. 40, 2876-82 [0081]
- *Molec. Immunol.*, 1992, vol. 29 (5), 633-9 [0084]
- *Computational Molecular Biology.* Oxford University Press, 1988 [0102]

- Biocomputing: Informatics and Genome Projects. Academic Press, 1993 [0102]
- Computer Analysis of Sequence Data. Humana Press, 1994 [0102]
- **von Heinje, G.** Sequence Analysis in Molecular Biology. Academic Press, 1987 [0102]
- Sequence Analysis Primer M. Stockton Press, 1991 [0102]
- **Carillo et al.** *SIAM J. Applied Math.*, 1988, vol. 48, 1073 [0102]
- **Devereux et al.** *Nucl. Acid. Res.*, 1984, vol. 12, 387 [0103]
- **Altschul et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0103]
- **Dayhoff et al.** Atlas of Protein Sequence and Structure. 1978, vol. 5 [0105]
- **Henikoff et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 10915-10919 [0105]
- **Needleman et al.** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443-453 [0106]
- Immunology - Asynthesis. Sinauer Associates, 1991 [0111]
- **Lewin, B.** Genes V. Oxford University Press, 1994, 11 [0115]
- **Kyte et al.** *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 157, 105-131 [0118]
- **Moult J.** *Curr. Op. in Biotech.*, 1996, vol. 7 (4), 422-427 [0125] [0140]
- **Chou et al.** *Biochemistry*, 1974, vol. 13 (2), 222-245 [0125] [0140]
- **Chou et al.** *Biochemistry*, 1974, vol. 113 (2), 211-222 [0125] [0140]
- **Chou et al.**, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1978, vol. 47, 45-148 [0125] [0140]

- Chou *et al.* *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 47, 251-276 [0125]
[0140]
- Chou *et al.* *Biophys. J.*, 1979, vol. 26, 367-384 [0125]
[0140]
- Holm *et al.* *Nucl. Acid. Res.*, 1999, vol. 27 (1), 244-247
[0125] [0140]
- Brenner *et al.* *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1997, vol. 7 (3),
369-376 [0125] [0140]
- Jones, O. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1997, vol. 7(3),
377-87 [0126] [0141]
- Sippi *et al.* *Structure*, 1996, vol. 4 (1), 15-19 [0126]
- Bowie *et al.* *Science*, 1991, vol. 253, 164-170 [0126]
[0141]
- Gribskov *et al.* *Meth. Enzym.*, 1990, vol. 183, 146-159
[0126] [0141]
- Gribskov *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1987, vol. 84
(13), 4355-4358 [0126]
- Creighton, T.E. *Proteins: Structure and Molecule Properties*. W. H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0135]
- Sippi *et al.* *Structure*, 1996, vol. 4 (1), 15-9 [0141]
- Gribskov *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1987, vol. 84
(13), 4355-8 [0141]
- Alberts *et al.* *Thirteenth Am. Pep. Symp.*, 1993, 357-9
[0143]
- Creighton. *Proteins: Structure and Molecule Properties*.
W. H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0152]
- Nachman *et al.* *Regul. Pept*, 1995, vol. 57, 359-370 [0155]
- Tam *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, vol. 105, 6442 [0157]
- Merrifield. *Science*, 1986, vol. 232, 341-347 [0157]
- Barany; Merrifield. *The Peptides*. Academic Press, 1-284
[0157]

- **Barany et al.** *Int. J. Pep. Protein Res.*, 1987, vol. 30, 705-739 [0157]
- **Coligan et al.** *Curr. Prot. Immunol.* Wiley Inter- science, 1991 [0158]
- **Ausubel et al.** *Current Protocols in Molecular Biology.* Current Protocols Press, 1994 [0162]
- **Smith et al.** *J. Virol.*, 1983, vol. 46, 584 [0169]
- **Engelhard et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 1994, vol. 91, 3224-7 [0169]
- **Better et al.** *Science*, 1988, vol. 240, 1041-43 [0174]
- **Capaldi et al.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1977, vol. 76, 425 [0186]
- *Methods in Cell Biology. Antibodies in Cell Biology.* Academic Press, Inc, 1993, vol. 37 [0187]
- **Akerstrom.** *J Immunol.*, 1985, vol. 135, 2589-2542 [0188]
- **Chaubert.** *Mod. Pathot*, 1997, vol. 10, 585-591 [0188]
- **Harlow; Lane.** *Antibodies, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0190]
- **Harlow; Lane.** *Antibodies, A Laboratory Manual.* 579-583 [0191]
- **Maddox et al.** *J. Exp. Med*, 1983, vol. 158, 121 [0197]
- **Bayer et al.** *Meth. Enz.*, 1990, vol. 184, 138-163 [0199]
- **Ogoshi et al.** *J. Inv. Dermatol.*, 1998, vol. 110, 818-23 [0210]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences.* Mack Publishing Company, 1990 [0215]
- **Sidman et al.** *Biopolymers*, 1983, vol. 22, 547-556 [0229]
- **Langer et al.** *J. Biomed. Mater. Res.*, 1981, vol. 15, 167-277 [0229]
- **Langer et al.** *Chem. Tech.*, 1982, vol. 12, 98-105 [0229]

- **Eppstein et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1985, vol. 82, 3688-3692 [0229]
- Genbank. AF004327 [0248]
- Genbank. AF004326 [0248]
- **Tartof; Hobbs.** *Improved media for growing plasmid and cosmid clones*, 1987, vol. 9, 12 [0288]
- **Maniatis et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000 [0314]
- **Maniatis et al.** *Molecular Cloning* [0318]
- **Feige et al.** *Cellular Molec. Life Sci.*, 2000, vol. 57, 1457-1470 [0356]

Lisboa, 22/12/2009

REIVINDICAÇÕES

1. Um polipéptido que compreende pelo menos uma sequência de aminoácidos seleccionada entre o conjunto constituído por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 76 até à SEQ ID NO: 118, em que o referido polipéptido é capaz de se ligar a Ang-2, e seus sais fisiologicamente aceitáveis.

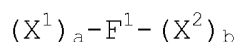
2. Um polipéptido de fusão que compreende pelo menos um polipéptido de acordo com a reivindicação 1 e um veículo, em que o referido polipéptido de fusão é capaz de se ligar a Ang-2, e seus sais fisiologicamente aceitáveis.

3. O polipéptido de fusão de acordo com a reivindicação 2, em que o referido veículo é pelo menos um seleccionado entre um domínio Fc, polietileno-glicol, um lípido, um grupo colesterol, um hidrato de carbono e um oligossacarídeo.

4. O polipéptido de acordo com a reivindicação 1, o qual é cíclico.

5. Um dímero ou multímero dos polipéptidos de acordo com a reivindicação 1.

6. Uma composição de substância que possui a fórmula geral:



e seus multímeros, em que:

o radical F^1 representa um veículo, em que o referido veículo é um domínio Fc, polietileno glicol, um lípido, um grupo colesterol, um hidrato de carbono ou um oligossacarídeo;

cada um dos radicais X_1 e X_2 é seleccionado independentemente entre:

$-(L^1)_c-P^1$;

$-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2$;

$-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3$; e

$-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3-(L^4)_f-P^4$;

em que um ou mais dos símbolos P^1 , P^2 , P^3 e P^4 compreende cada um independentemente um polipéptido seleccionado entre o conjunto constituído por: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 76 até à SEQ ID NO: 118, inclusive;

cada um dos símbolos L^1 , L^2 , L^3 e L^4 representa independentemente um *linker*; e

cada um dos símbolos a, b, c, d, e e f representa independentemente o número 0 ou 1, desde que pelo menos um dos símbolos a e b represente 1; e seus sais fisiologicamente aceitáveis

7. A composição de substância da reivindicação 6, de fórmula geral:

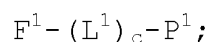


ou



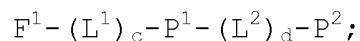
e seus sais fisiologicamente aceitáveis.

8. A composição de substância da reivindicação 6, de fórmula geral:



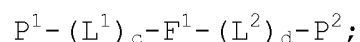
e seus sais fisiologicamente aceitáveis.

9. A composição de substância da reivindicação 6, de fórmula geral:



e seus sais fisiologicamente aceitáveis.

10. A composição de substância da reivindicação 6, de fórmula geral:



e seus sais fisiologicamente aceitáveis.

11. A composição de substância da reivindicação 6, em que o símbolo F^1 representa um domínio Fc ou um seu fragmento.

12. A composição de substância da reivindicação 6, em que o radical F^1 compreende a sequência de aminoácidos designada por SEQ ID NO:60

13. Um polinucleótido que codifica um polipéptido de acordo com a reivindicação 1.

14. Um vector de expressão que compreende o polinucleótido da reivindicação 13.

15. Uma célula hospedeira que compreende o vector de expressão da reivindicação 14.

16. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 15, em que a célula é procariótica.

17. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 16, em que a célula é de *E. coli*.

18. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 15, em que a célula é eucariótica.

19. Um polipéptido de acordo com qualquer uma das sequências SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4.

20. Uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de um polipéptido de acordo com a reivindicação 1 misturado com um seu veículo farmacêuticamente aceitável.

21. Um polipéptido de acordo com a reivindicação 2 ou 6, para utilização num método para tratar a angiogénese num paciente, consistindo tal método em administrar-lhe uma quantidade eficaz do polipéptido.

22. Um polipéptido de acordo com a reivindicação 21, para utilização num método para tratar a angiogénese, em que o referido método consiste em inibir a angiogénese indesejada num mamífero, mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipéptido.

23. Um polipéptido de acordo com a reivindicação 21 para utilização num método para tratar a angiogénese em que o referido método em consiste em modular a angiogénese num mamífero, mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipéptido.

24. Um polipéptido de acordo com a reivindicação 21 para utilização num método para tratar a angiogénese em que o referido método em consiste em inibir o crescimento tumoral **caracterizado por** angiogénese indesejada num mamífero, mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipéptido.

25. Uma composição que compreende um polipéptido de acordo com a reivindicação 2 ou 6 e um agente quimioterapêutico para utilização num método para tratamento do cancro num mamífero, mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipéptido e do agente quimioterapêutico.

26. O polipéptido e agente quimioterapêutico de acordo com a reivindicação 25, em que o agente quimioterapêutico é seleccionado pelo menos entre 5-FU, CPT-11 e taxotere.

27. Um polipéptido de acordo com a reivindicação 2 ou 6, para utilização num método para modular pelo menos a permeabilidade vascular ou as perdas de plasma num mamífero, mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipéptido.

28. Um polipéptido de acordo com a reivindicação 2 ou 6 para utilização num método para tratar pelo menos uma patologia seleccionada entre doença neovascular ocular, obesidade, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerose, perturbações inflamatórias, aterosclerose, endometriose, doença neoplásica, doença relacionada com os ossos ou

psoríase num mamífero, mediante a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do polipéptido.

29. Um polipéptido capaz de se ligar a Ang-2, compreendendo tal polipéptido a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 25), e seus sais fisiologicamente aceitáveis.

30. O polipéptido de acordo com a reivindicação 29, em que a sequência de aminoácidos de Fc na SEQ ID NO: 25 está explicitada na SEQ ID NO: 60.

31. Um polinucleótido que codifica um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 e 30.

32. O polinucleótido de acordo com a reivindicação 31, conforme explicitado na SEQ ID NO: 46.

33. Um vector de expressão que compreende o polinucleótido das reivindicações 31 ou 32.

34. Uma célula hospedeira que compreende o vector de expressão da reivindicação 33.

35. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 34 em que a célula é de *E. coli*.

39. Uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 e 30, misturado com um seu veículo farmacêuticamente aceitável.

37. Um polipéptido de acordo com as reivindicações 29 e 30 para utilização num método para inibir a angiogénese num mamífero mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do referido polipéptido.

38. Um polipéptido de acordo com as reivindicações 29 e 30 para utilização num método para tratar a angiogénese num paciente, mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do referido polipéptido.

39. Um polipéptido de acordo com as reivindicações 29 e 30 para utilização num método para modular a angiogénese num mamífero, mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do referido polipéptido.

40. Um polipéptido de acordo com as reivindicações 29 e 30 para utilização num método para inibir o crescimento tumoral **caracterizado por** angiogénese indesejada num mamífero, mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do referido polipéptido.

41. Uma composição que compreende um polipéptido de acordo com as reivindicações 29 e 30 e um agente quimioterapêutico para utilização num método para tratar o cancro num mamífero mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz dos referidos polipéptido e agente quimioterapêutico.

42. O método de acordo com as reivindicação 41, em que o agente quimioterapêutico é seleccionado pelo menos entre 5-FU e Taxotere.

43. Um polipéptido de acordo com as reivindicações 29 e 30 para utilização num método para modular pelo menos a permeabilidade vascular ou as perdas de plasma num mamífero, mediante a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do referido polipéptido.

44. Um polipéptido de acordo com as reivindicações 29 e 30 para tratar pelo menos uma patologia seleccionada entre doença neovascular ocular, obesidade, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerose, doença inflamatória, perturbações inflamatórias, aterosclerose, endometriose, doença neoplásica, doença relacionada com os ossos ou psoríase num mamífero, mediante a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do referido polipéptido.

Lisboa, 22/12/2009

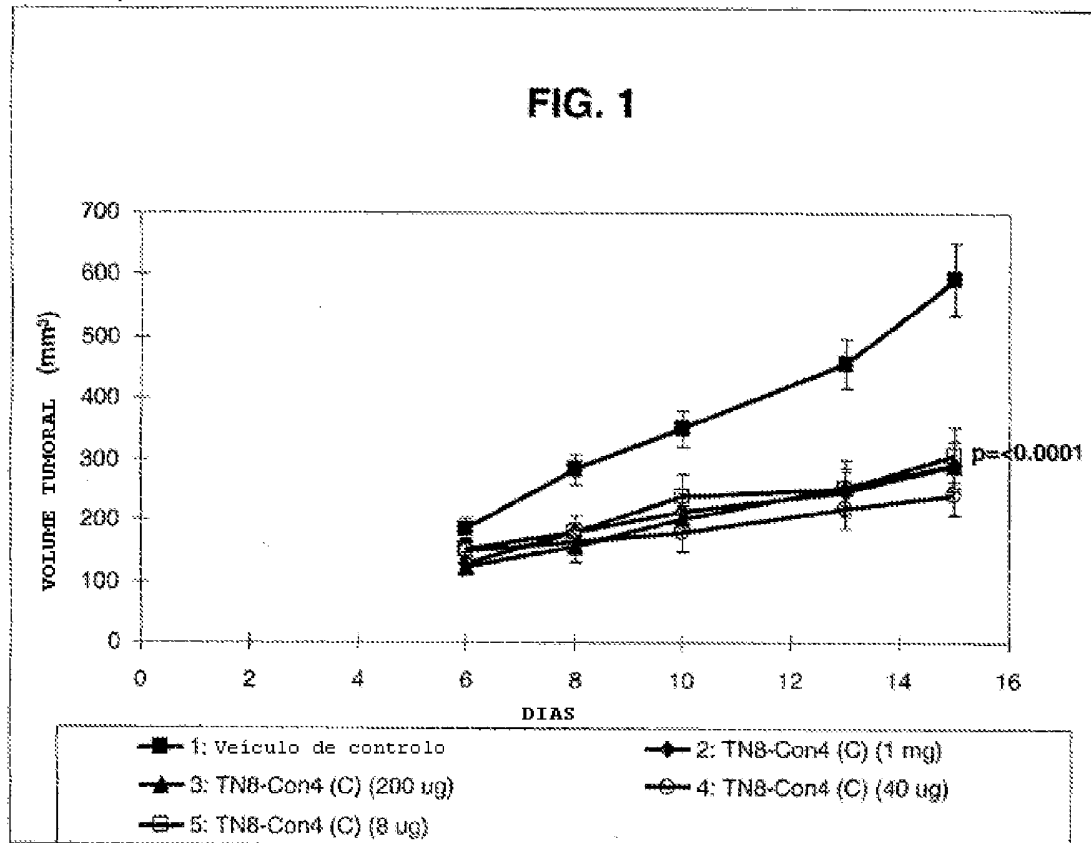


Figura 2

Pepticoorpo PK em murganhos (50 ug dose)

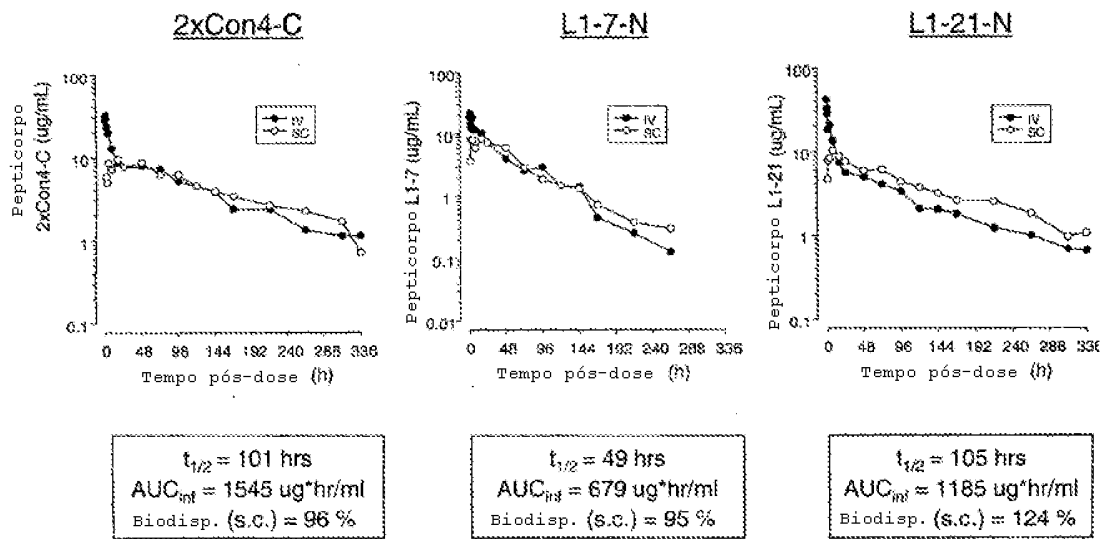


Figura 3

Os peptícorpos anti-Ang2 inibem o crescimento do xenoenxerto tumoral A431

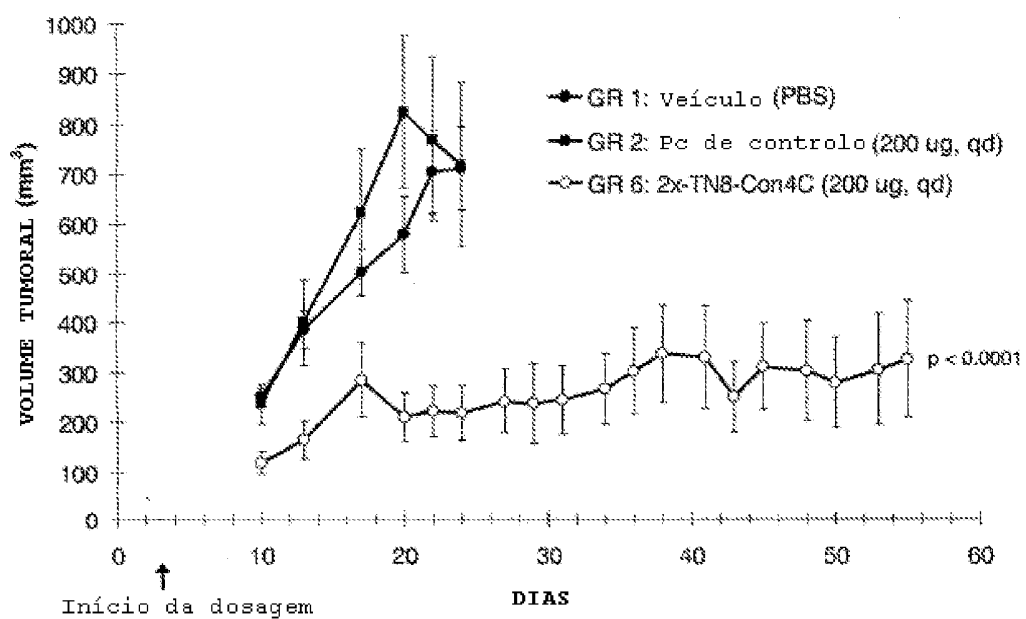


Figura 4

O peptícorpo anti-Ang2 a 1 mg/mL não tem nenhum efeito sobre o crescimento de células A431 em cultura

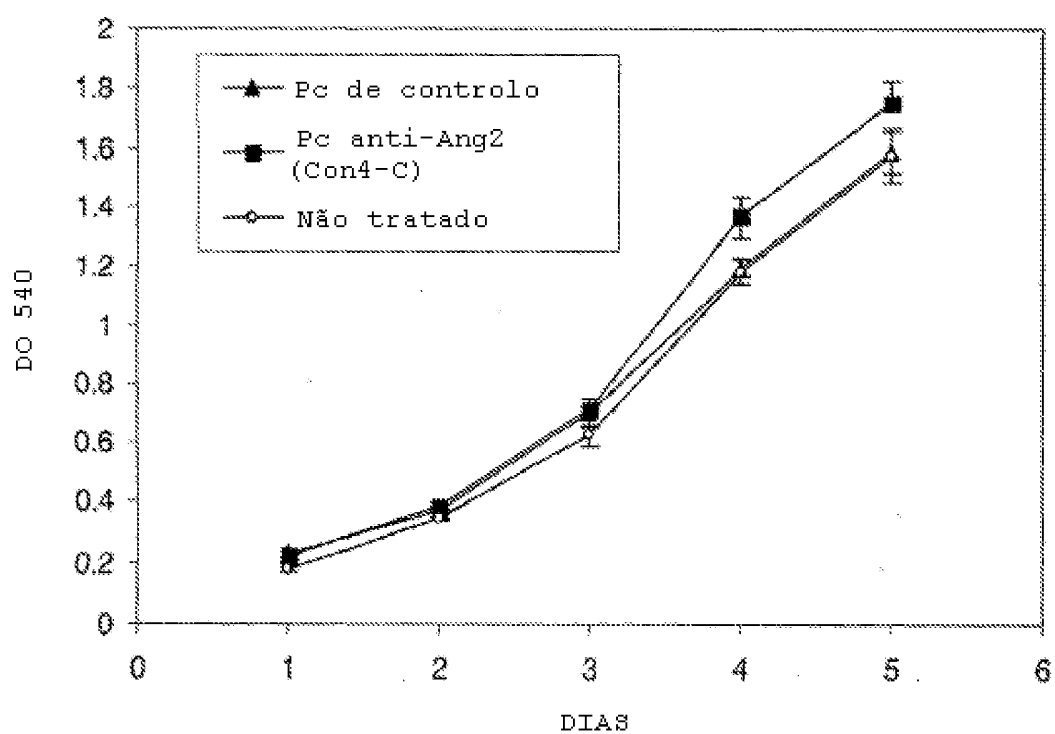


Figura 5

Os peptídeos anti-Ang2 inibem o crescimento tumoral em Colo205

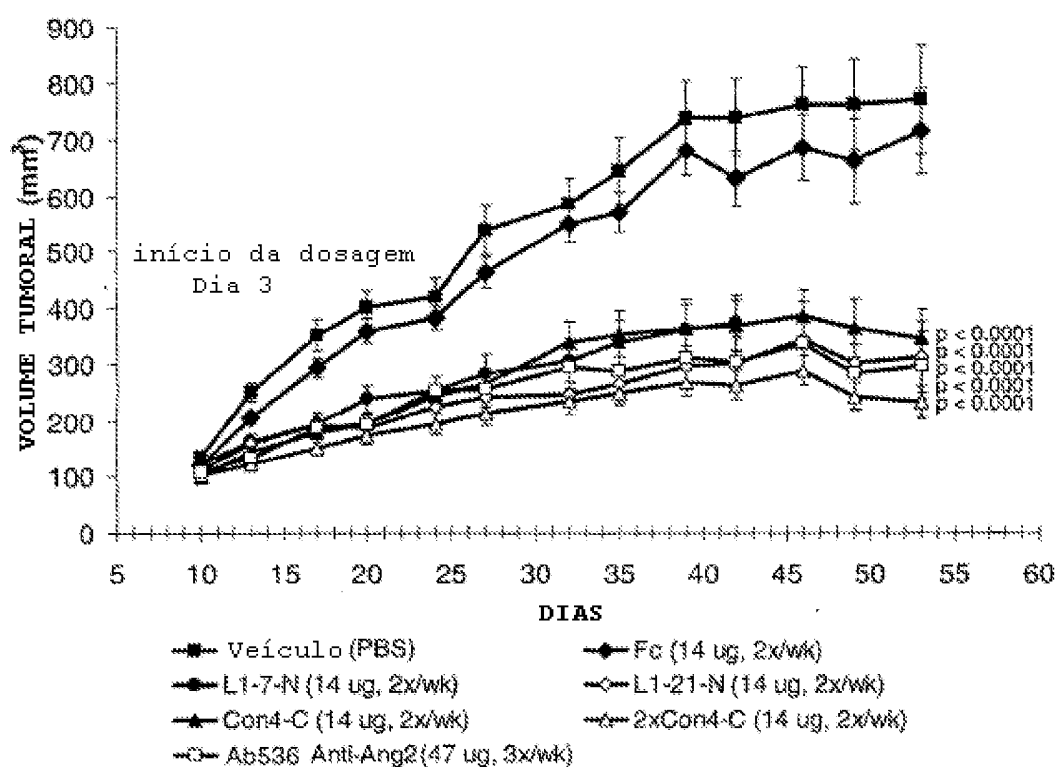


Figura 6

Os peptídeos anti-Ang2 inibem o crescimento tumoral em Colo2005

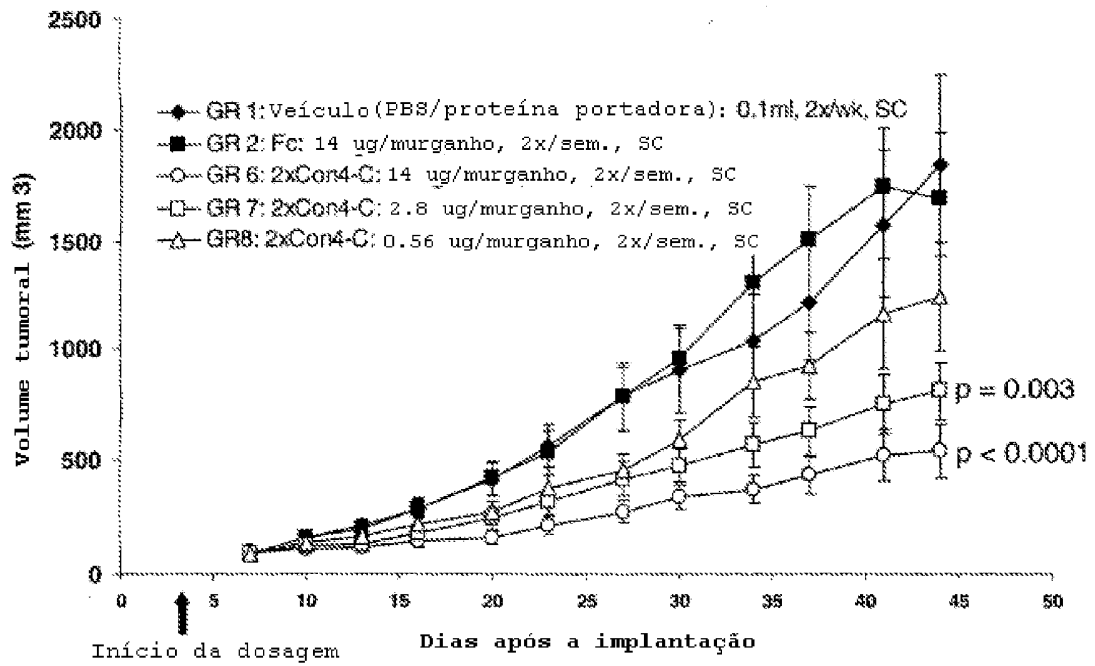


Figura 7
A terapia com o peptícorpo anti-Ang2 reduz a densidade de contrastação de xenoinxertos tumorais Colo205 com CD31

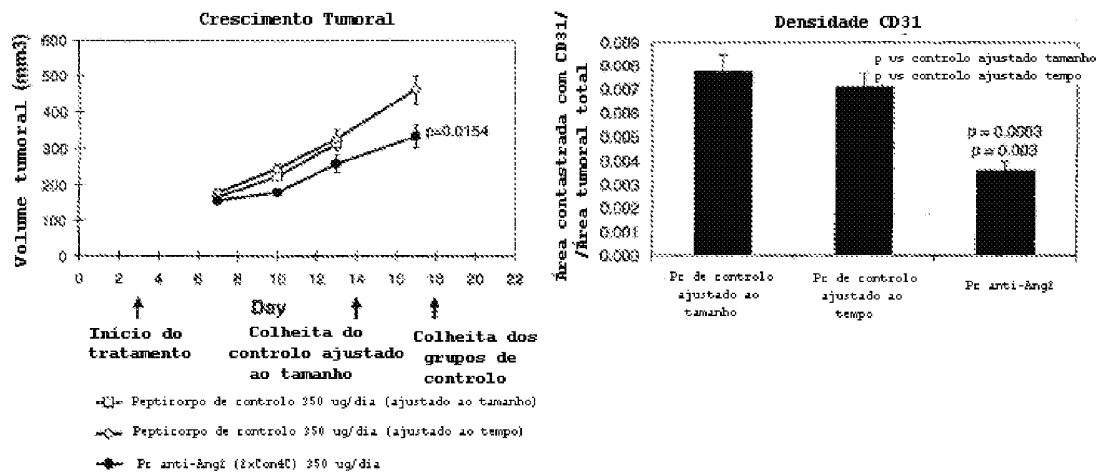


Figura 8

Os Pc anti-Ang2 inibem o crescimento tumoral Colo205, independentemente do momento em que começa a doagem

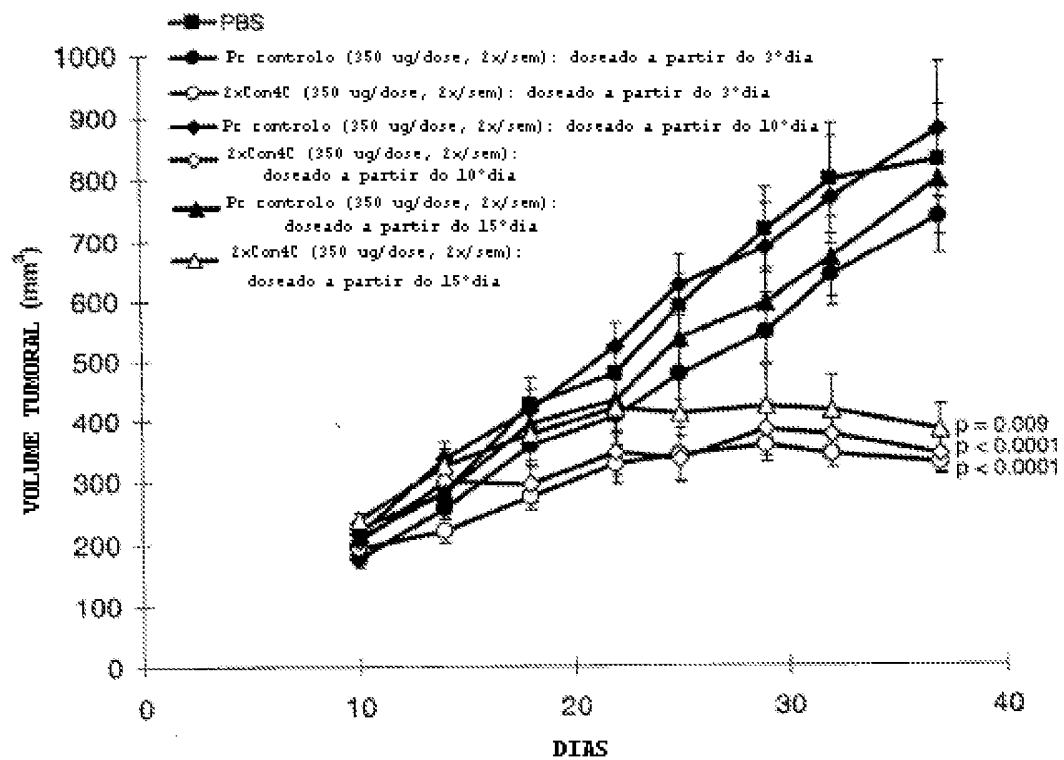


Figura 9**Valores de resposta completa em estudos de dosagens a longo prazo**

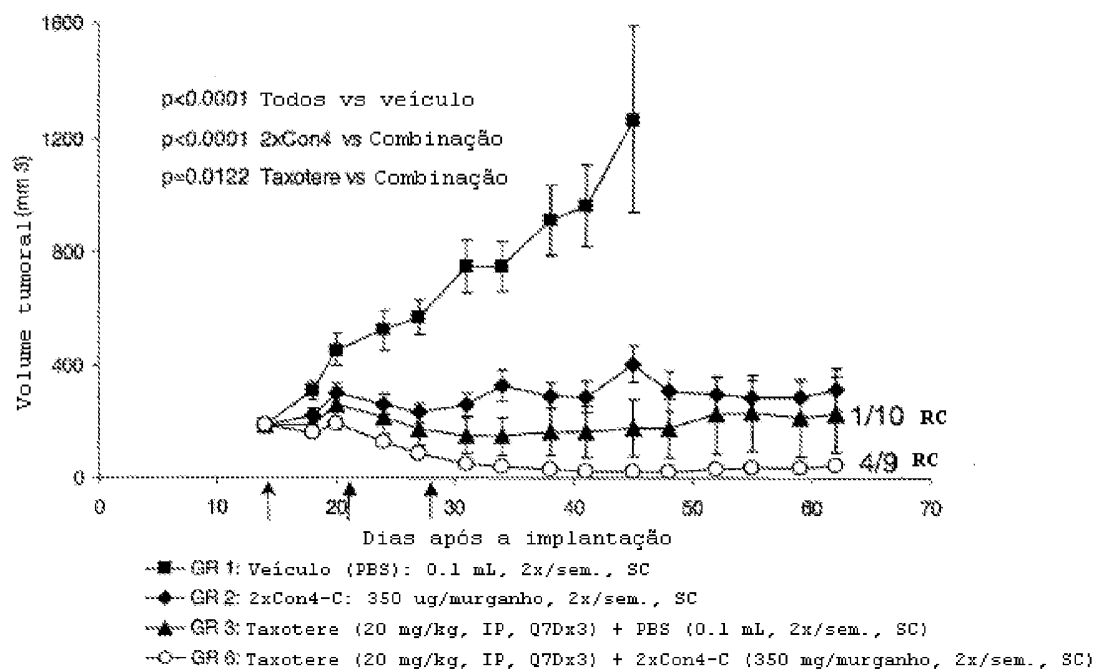
<u>Estudo</u>	<u>Modelo Tumoral</u>	<u>Terapia</u>	<u>Programa de dosagem *</u>	<u>Duração da dosagem (semanas)</u>	<u>% de RC</u>
082801	A431	Ab 536	46.7 ug, 3x/sem.	10	60**
100201	A431	Ab 536	46.7 ug, 3x/sem.	11	40**
100201	A431	2xCon4-C	200 ug/dia	11	30**
100201	A431	2xCon4-C	40 ug/dia	11	0
100201	A431	2xCon4-C	8 ug/dia	11	20
012902	Colo205	Ab 536	46.7 ug, 3x/sem.	12	10
012902	Colo205	2xCon4-C	140 ug/sem.	12	0
031802	Colo205	2xCon4-C	350 ug, 2x/sem.	10	20
111901	Colo205	Ab 536	46.7 ug, 3x/sem.	21	20
042602	Colo205	2xCon4-C	14 ug, 2x/sem.	11	21

* em todos os estudos, a dosagem começou ao 3º dia

** Fármaco retirado depois de alcançados os valores CR e sem se observar nenhum novo desenvolvimento tumoral. Acompanhamento medio de 15,3 semanas (intervalo de 6-27 semanas)

Figura 10a

A combinação de Pc com Taxotere no modelo tumoral Colo205



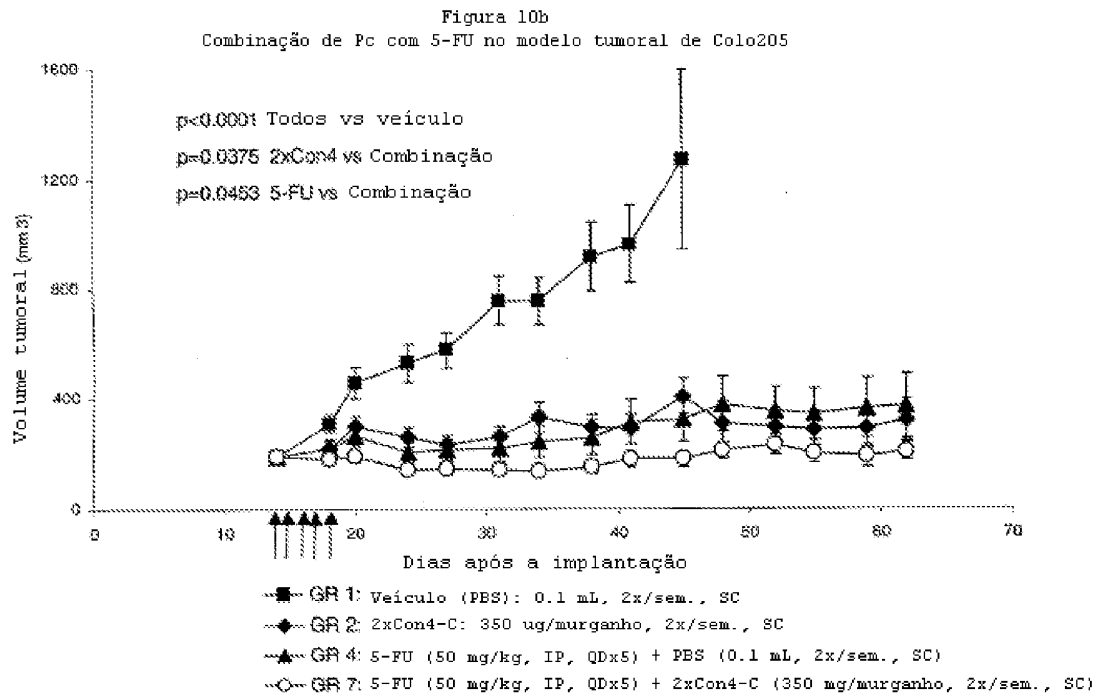


Figura 11a

Os anticorpos anti-Ang2 inibem o inchaço da pata no modelo de artrite induzida com adjuvante

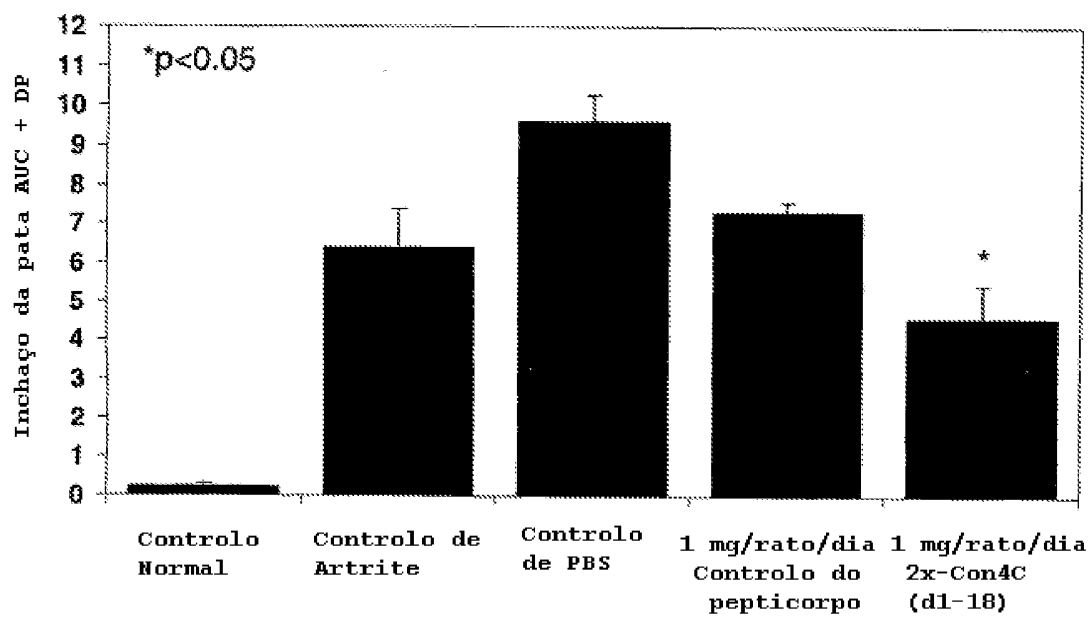


Figura 11b
Os peptícorpos anti-Ang2 inibem a perda de densidade mineral óssea no modelo de artrite induzida com adjuvante

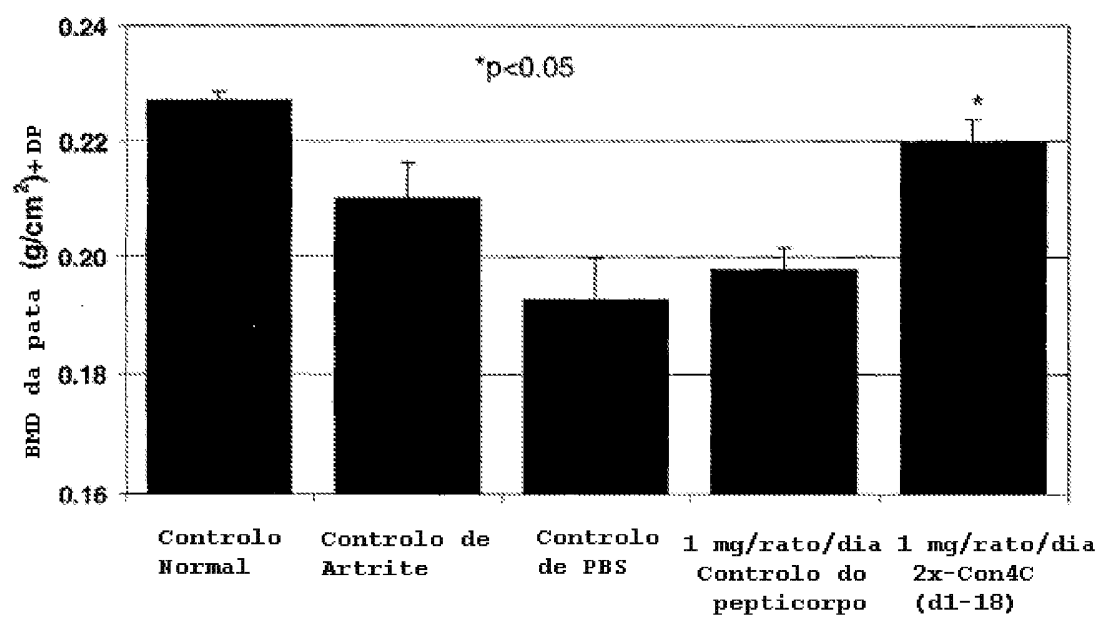


Figura 11c
Efeito dos peptícorpos anti-Ang2 sobre a perda de massa corporal no modelo de artrite induzida por adjuvante

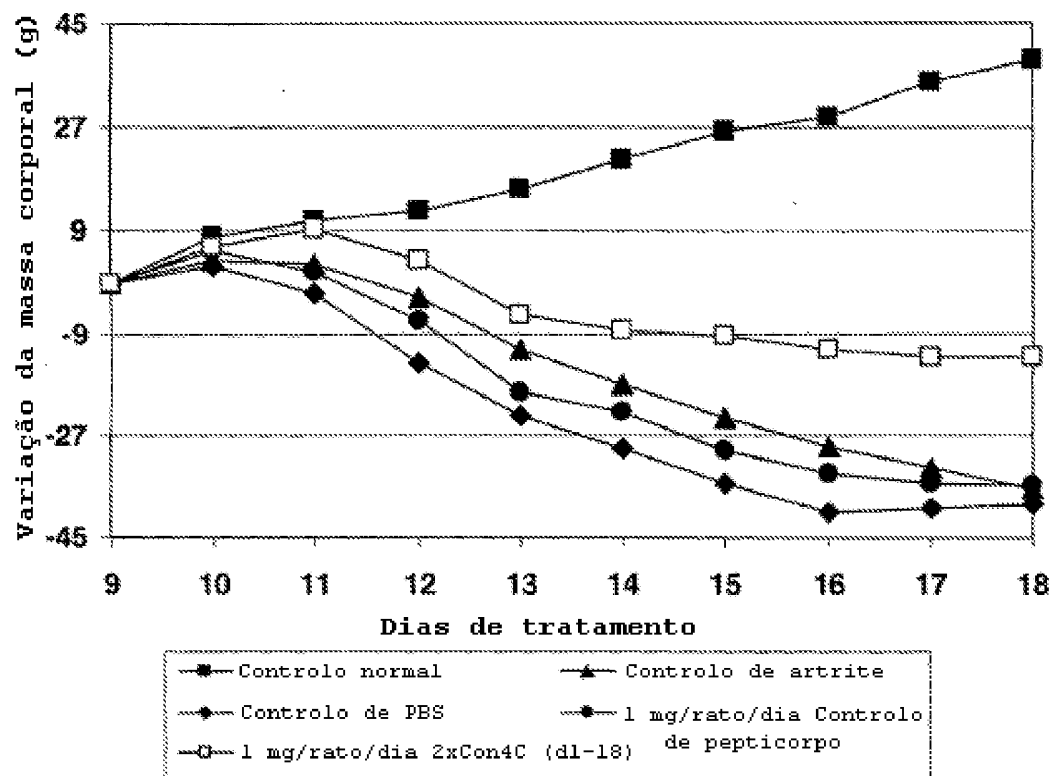


Figura 12

O peptícorpo CON-4 inibe a angiogenese
corneal induzida por VEGF

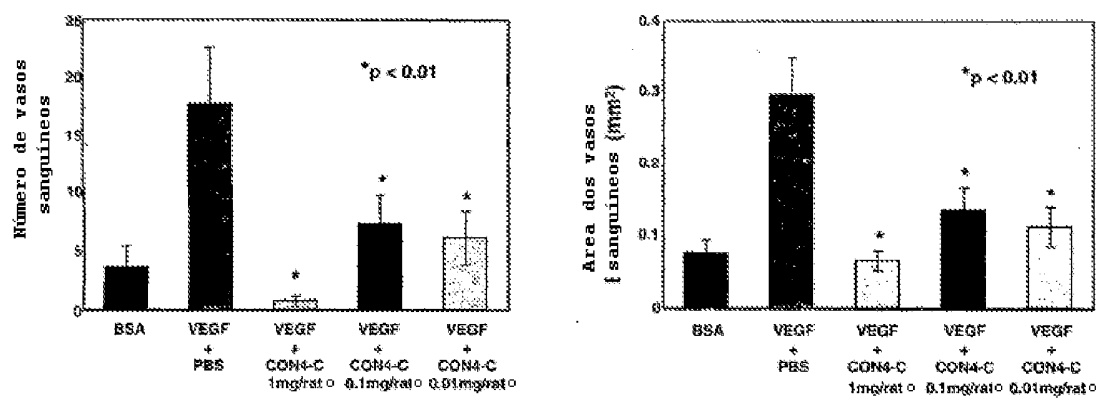


Figura 13a

Mapeamento de epítomos

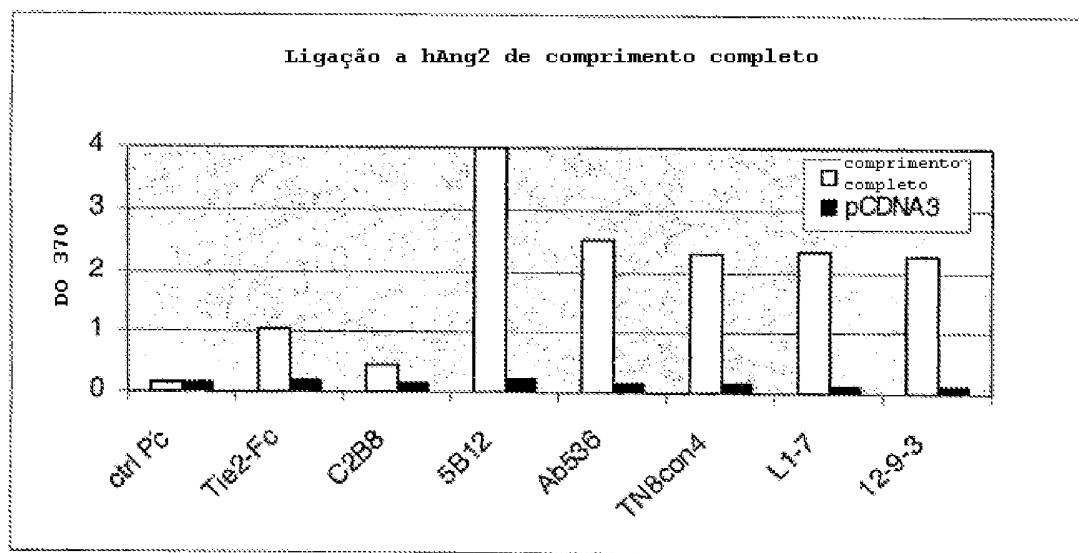


Figura 13b
Mapeamento de epítomos

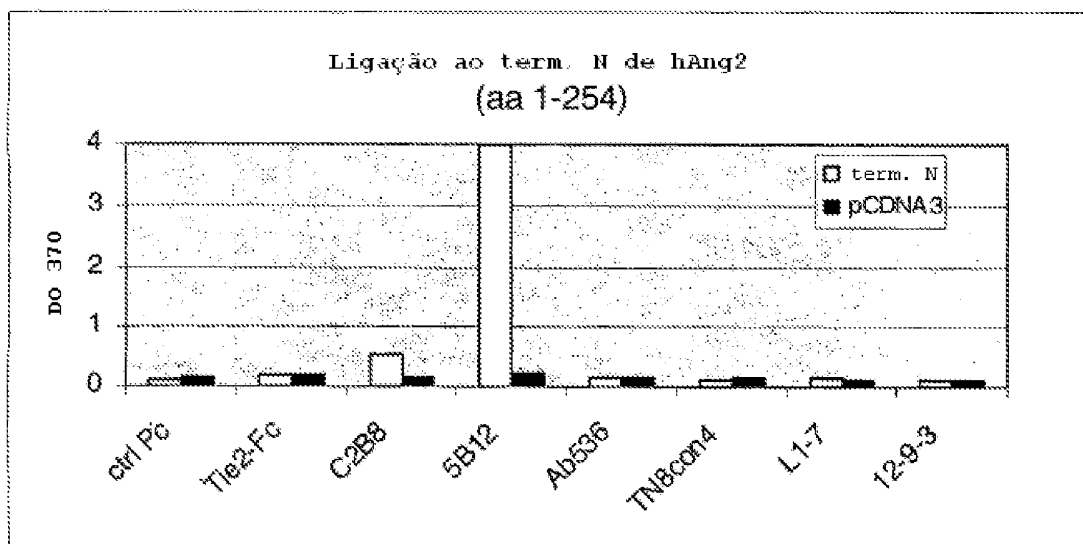


Figura 13c
Mapeamento de epítomos

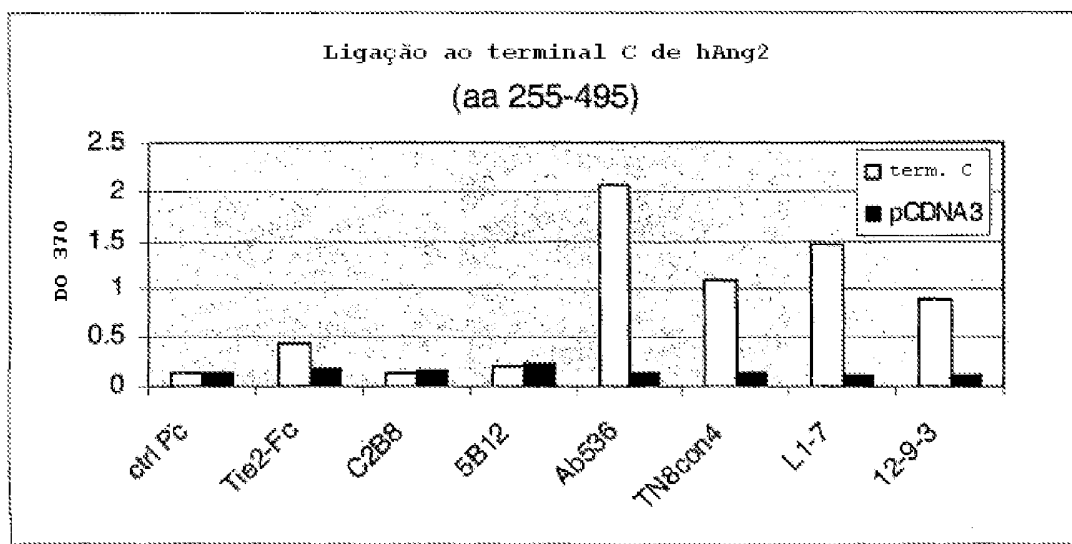


Figura 14

