



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112015005466-8 B1**

**(22) Data do Depósito:** 12/09/2013

**(45) Data de Concessão:** 11/04/2023

**(54) Título:** POLIPEPTÍDEO E SEU USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SEU USO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA, E MÉTODO DE DETECÇÃO OU MEDIÇÃO DA MIOSTATINA EM UMA AMOSTRA

**(51) Int.Cl.:** C07K 14/435.

**(30) Prioridade Unionista:** 13/03/2013 US 61/780,005; 13/09/2012 US 61/700,697.

**(73) Titular(es):** BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY.

**(72) Inventor(es):** SHARON CLOAD; LINDA ENGLE; DASA LIPOVSEK; MALAVI MADIREDDI; GINGER CHAO RAKESTRAW; JOANNA SWAIN; WENJUN ZHAO; HUI WEI; AARON P. YAMNIUK; VIDHYASHANKAR RAMAMURTHY; ALEXANDER T. KOZHICH; MARTIN J. CORBETT; STANLEY RICHARD KRYSTEK JR..

**(86) Pedido PCT:** PCT US2013059458 de 12/09/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2014/043344 de 20/03/2014

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 11/03/2015

**(57) Resumo:** POLIPEPTÍDEO E SEU USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SEU USO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA, E MÉTODO DE DETECÇÃO OU MEDIÇÃO DA MIOSTATINA EM UMA AMOSTRA. A presente invenção refere-se a proteínas de domínio arcabouço à base de fibronectina que se ligam à miostatina. A invenção também se refere à utilização dessas proteínas em aplicações terapêuticas para o tratamento de distrofia muscular, caquexia, sarcopenia, osteoartrite, osteoporose, diabetes, obesidade, DPOC, doença renal crônica, insuficiência cardíaca, enfarte do miocárdio e fibrose. A invenção refere-se ainda a células compreendendo tais proteínas, polinucleotídeos que codificam tais proteínas ou fragmentos dos mesmos, e a vetores que compreendem os polinucleotídeos que codificam as proteínas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"POLIPEPTÍDEO E SEU USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SEU USO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA, E MÉTODO DE DETECÇÃO OU MEDIÇÃO DA MIOSTATINA EM UMA AMOSTRA".**

#### REFERÊNCIA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade para o Pedido Provisório norte-americano No. 61/700.697 "Fibronectin based scaffold domain proteins that bind to myostatin" depositado em 13 de setembro de 2012, e Pedido Provisório norte-americano No. 61/780.005 intitulado "Fibronectin based scaffold domain proteins that bind to myostatin" depositado em 13 de março de 2013, a totalidade de cada um dos quais é aqui incorporada por referência.

#### CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a proteínas de domínio arcabouço (scaffold) à base de fibronectina que se ligam à miostatina. A invenção também se refere à utilização das proteínas em aplicações terapêuticas inovadoras para o tratamento de doenças com desperdício muscular e distúrbios metabólicos. A invenção refere-se ainda a células compreendendo tais proteínas, polinucleotídeos que codificam tais proteínas ou fragmentos dos mesmos, e a vetores que compreendem os polinucleotídeos que codificam as proteínas inovadoras.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] A miostatina, também conhecida como fator de diferenciação e crescimento 8 (GDF-8), é um membro da superfamília do fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) de fatores de crescimento secretados. A miostatina tem todas as características estruturais comuns para as proteínas da família TGF- $\beta$ : um terminal amino hidrofóbico que atua como um sinal de secreção, nove resíduos de cisteína invariantes, e um local de processamento proteolítico "RXXR"

do tipo furina. A clivagem proteolítica da proteína dá origem a um domínio C-terminal que forma um homodímero que é a forma biologicamente ativa de miostatina (Thies et al., *Growth Factors* 2001; 18 (4): 251-9). Os alinhamentos do fragmento C-terminal de sequências de aminoácidos de miostatina a partir de várias espécies de vertebrados revelam que a proteína é altamente conservada (100% de identidade) entre o ser humano, macaco, vaca, cão, camundongo, rato, frango e peru (McPherron et al. PNAS, 94: 12457-61, 1997).

[004] A expressão da miostatina está limitada principalmente ao músculo esquelético e tecido adiposo, onde foi demonstrada ser um regulador negativo do desenvolvimento do músculo esquelético (Lee LS, *Immunol Endocr agentes Metab Med Chem.* 2010; 10: 183-194). Nos mamíferos, o músculo esquelético parece ser o principal tecido alvo de miostatina, onde se liga aos receptores de superfície celular, que conduz à perda de massa muscular. Camundongos e gado com deficiências genéticas em miostatina apresentam aumentos dramáticos na massa muscular esquelética, ou seja, o fenótipo "musculatura dupla", portanto, suportam o papel da miostatina na supressão do crescimento muscular (McPherron e Lee, *Proc Natl Acad Sci USA.* 23 de dezembro de 2003; 100 (26): 15842-6). A hipertrofia muscular em raças bovinas azul belga e piemonteses é devido a uma mutação sem sentido no terceiro éxon do gene da miostatina bovina (Bass et al., *Domest Anim Endocrinol.* 1999; 17 (2-3): 191-7). Superexpressão transgênica de inibidores da miostatina também resulta em hipermusculosidade. Crescimento muscular reforçado nestes animais é devido a um aumento tanto do número de células, ou o crescimento hiperplásico, e o tamanho da célula, ou crescimento hipertrófico, o que resulta em miofibras maiores e mais pesadas. O aumento da massa do músculo esquelético, devido a uma mutação de miostatina também tem sido relatado em seres humanos. Inibição da miostatina efetivamente aumenta a massa

muscular esquelética e a força, tanto no período pós-natal quanto em adultos.

[005] Os aumentos na massa muscular esquelética e força também estão associados com adaptações metabólicas que afetam positivamente a composição corporal, gasto energético, homeostase da glicose e as necessidades de insulina. Ambos os resultados genéticos e farmacológicos indicam que a miostatina regula o metabolismo de energia e que a sua inibição pode atenuar significativamente a progressão de doenças metabólicas, incluindo a obesidade e diabetes. Por exemplo, a camundongos nulos para miostatina exibem diminuição do acúmulo de gordura corporal (McPherron e Lee, J. JCI 109: 595, 2002), quando comparados com camundongos de tipo selvagem da mesma idade. Esta redução de gordura corporal é uma manifestação de número e tamanho reduzidos dos adipócitos, o que implica um papel significativo de miostatina em adipogênese, bem como na miogênese.

[006] Deste modo, a miostatina é um alvo desejável para a intervenção terapêutica ou profilática para o tratamento de distúrbios ou condições que possam beneficiar um aumento na massa muscular, força muscular e/ou o metabolismo (por exemplo, distrofia muscular, fragilidade, atrofia por desuso e caquexia), distúrbios associados com perda de massa muscular (por exemplo, doença renal, insuficiência ou doença cardíaca, e doença do fígado), e doenças metabólicas (por exemplo, diabetes tipo II, síndrome metabólica, obesidade e osteoartrite).

[007] Por conseguinte, seria vantajoso obter melhores proteínas de domínio arcabouço de fibronectina que se ligam à miostatina para o tratamento terapêutico de, por exemplo, distúrbios metabólicos, doenças de desperdício muscular, e perda de massa muscular devido à inatividade.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] A presente invenção é baseada, pelo menos em parte, na descoberta de Adnectinas que se ligam e antagonizam a miostatina. Especificamente, Adnectinas antimiostatina da presente invenção inibem a atividade da miostatina, afetando assim a sinalização SMAD a montante. Um mecanismo responsável para a sinalização SMAD alterada de alguns das Adnectinas antimiostatina da invenção envolvem a inibição do recrutamento de Alk4 para o complexo miostatina-ActRIIb, cujas consequências fisiológicas são volume e peso corporal muscular aumentados.

[009] Em um aspecto, a invenção proporciona um polipeptídeo compreendendo um domínio de fibronectina de tipo III a décima (<sup>10</sup>Fn3), em que o <sup>10</sup>Fn3 tem pelo menos uma alça (loop) selecionada a partir da alça BC, DE e FG com uma alteração da sequência de aminoácidos em relação à sequência da alça correspondente do domínio <sup>10</sup>Fn3 humano, e em que o polipeptídeo se liga a miostatina. Em certas modalidades, o polipeptídeo liga-se a miostatina com um K<sub>D</sub> inferior a 500 nM.

[0010] Em algumas modalidades, a alça BC do polipeptídeo da invenção compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>1</sub>-L-P-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>, em que (a) X<sub>1</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em S, T e Y; (b) X<sub>2</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em H, Y, N, R, F, G, S e T; (c) X<sub>3</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, P, Q, S, F, H, N e R; (d) X<sub>4</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em G e A; (e) X<sub>5</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em H, L, R, V, N, D, F, I e K; (f) X<sub>6</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, L, G, M, F, I e V; e (g) X<sub>7</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em H e N. Em certas modalidades, X<sub>1</sub> é S, e/ou X<sub>2</sub> é H ou Y, e/ou X<sub>3</sub> é A ou P, e/ou X<sub>4</sub> é G, e/ou X<sub>5</sub> é H, L ou R, e/ou X<sub>6</sub> é A ou L., e/ou X<sub>7</sub> é H.

[0011] Em outras modalidades, a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub>-P-X<sub>21</sub>-G-X<sub>22</sub>-

A, em que (a)  $X_{19}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em D, E, V e W; (b)  $X_{20}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, S e V; (c)  $X_{21}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em R, A, G, K e L; e (d)  $X_{22}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L e R. Em certas modalidades,  $X_{19}$  é D, e/ou  $X_{20}$  é A, S ou V, e/ou  $X_{22}$  é L.

[0012] Em algumas modalidades, a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G- $X_8$ , em que  $X_8$  é V ou L.

[0013] Em algumas modalidades, a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{23}$ -G-R-G- $X_{24}$ , em que (a)  $X_{23}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em V, P, F, I e L; e (b)  $X_{24}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em S, N e T.

[0014] Em algumas modalidades, a alça FG do polipeptídeo da invenção compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_9$ - $X_{10}$ - $X_{11}$ - $X_{12}$ - $X_{13}$ - $X_{14}$ - $X_{15}$ - $X_{16}$ - $X_{17}$ - $X_{18}$ , em que (a)  $X_9$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L, V e I; (b)  $X_{10}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em T e S; (c)  $X_{11}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em K, R, A, G, S, D, H, N, T e P; (d)  $X_{12}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em S, T, A, E, H, K e N; (e)  $X_{13}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em K, G, Q, D, E, N, T e S; (f)  $X_{14}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em V, I, F, L, M, P, T e Y; (g)  $X_{15}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em I, L e Y; (h)  $X_{16}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em H, I, V, K, L, R, F, G, S e T; (i)  $X_{17}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em Y e H; e (j)  $X_{18}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em K, M, L, R e V.

[0015] Em certas modalidades,  $X_9$  é L ou V, e/ou  $X_{10}$  é T,  $X_{11}$  é K ou R, e/ou  $X_{12}$  é S ou T, e/ou  $X_{13}$  é K, G ou Q, e/ou  $X_{14}$  é V ou I, e/ou  $X_{15}$  é I, e/ou  $X_{16}$  é H, I ou V, e/ou  $X_{17}$  é Y e/ou  $X_{18}$  é K ou M.

[0016] Em outras modalidades, a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{25}$ - $X_{26}$ -R- $X_{27}$ -G- $X_{28}$ -

$X_{29}$ - $X_{30}$ - $X_{31}$ - $X_{32}$ , em que (a)  $X_{25}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em I e V; (b)  $X_{26}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, D e Y; (c)  $X_{27}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em D e T; (d)  $X_{28}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em P, M, V e T; (e)  $X_{29}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em V, L, N, R e S; (f)  $X_{30}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em H, T, L, N, Q e S; (g)  $X_{31}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, W, Y, H e L; e (h)  $X_{32}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em D, A e G.

[0017] Em certas modalidades,  $X_{25}$  é I, e/ou  $X_{26}$  é F, e/ou  $X_{27}$  é D, e/ou  $X_{28}$  é P, e/ou  $X_{29}$  é V, e/ou  $X_{30}$  é H ou T, e/ou  $X_{31}$  é F ou W, e/ou  $X_{32}$  é D.

[0018] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma alça BC e uma alça DE, ou uma alça BC e uma alça FG, ou uma alça DE e uma alça FG, ou uma alça BC, uma alça DE e uma alça FG.

[0019] Em algumas modalidades, a alça BC do polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7-38. Em outras modalidades, a alça DE compreende um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 39-45. Em ainda outras modalidades, a alça FG compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 46-79. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos de alça BC, DE, ou FG é pelo menos 80% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NOs: 7-38, 39-45, e 46-79, respectivamente. Em outras modalidades, o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, ou 99% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NOs: 80-123, 228-239, e 252-273. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 80-123, 228-239, e 252-273.

[0020] Em algumas modalidades, os polipeptídeos compreendem as combinações de alça de BC, DE e FG como mostrado na Tabela 1. Em uma modalidade, o polipeptídeo tem as alças a BC, DE e FG tal como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente.

[0021] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça BC tem 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições de aminoácidos, tais como substituições de aminoácidos conservadoras. Em algumas modalidades, a alça BC tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{33}$ -L-P- $X_{34}$ - $X_{35}$ - $X_{36}$ - $X_{37}$ - $X_{38}$ - $X_{39}$ , em que  $X_{33}$  é T ou Y;  $X_{34}$  é Y, N, R, F, G, S, ou T;  $X_{35}$  é A, P, S, F, H, N, ou R;  $X_{36}$  é A;  $X_{37}$  é H, L, R, V, N, D, F, ou I;  $X_{38}$  é L, G, M, F, I, ou V; e  $X_{39}$  é H.

[0022] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça DE tem 1 substituição de aminoácido, tal como uma substituição de aminoácido conservadora. Em algumas modalidades, a alça DE tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G- $X_{40}$ , em que  $X_{40}$  é L.

[0023] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça FG tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 substituições de aminoácidos, tais como substituições de aminoácidos conservadoras. Em algumas modalidades, a alça FG tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{41}$ - $X_{42}$ - $X_{43}$ - $X_{44}$ - $X_{45}$ - $X_{46}$ - $X_{47}$ - $X_{48}$ - $X_{49}$ - $X_{50}$ , em que  $X_{41}$  é L ou I;  $X_{42}$  é S;  $X_{43}$  é K, R, A, G, S, H, N, T, ou P;  $X_{44}$  é S, A, E, H, K, ou N;  $X_{45}$  é K, Q, D, E, N, T, ou S;  $X_{46}$  é V, I, F, L, M, P, ou T;  $X_{47}$  é I ou Y;  $X_{48}$  é H, I, V, L, R, F, G, S, ou T;  $X_{49}$  é H; e  $X_{50}$  é M, L, R, ou V.

[0024] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende as

alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça BC tem 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições de aminoácidos, tais como substituições de aminoácidos conservadoras, e a alça DE tem 1 substituição de aminoácido, tal como uma substituição de aminoácido conservadora. Em algumas modalidades, a alça BC tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{33}$ -L-P- $X_{34}$ - $X_{35}$ - $X_{36}$ - $X_{37}$ - $X_{38}$ - $X_{39}$ , em que  $X_{33}$  é T ou Y;  $X_{34}$  é Y, N, R, F, G, S, ou T;  $X_{35}$  é A, P, S, F, H, N, ou R;  $X_{36}$  é A;  $X_{37}$  é H, L, R, V, N, D, F, ou I;  $X_{38}$  é L, G, M, F, I, ou V; e  $X_{39}$  é H, e a alça DE tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G- $X_{40}$ , em que  $X_{40}$  é L.

[0025] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça BC tem 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições de aminoácidos, tais como substituições de aminoácidos conservadoras, e a alça FG tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 substituições de aminoácidos, tais como substituições de aminoácidos conservadoras. Em algumas modalidades, a alça BC tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{33}$ -L-P- $X_{34}$ - $X_{35}$ - $X_{36}$ - $X_{37}$ - $X_{38}$ - $X_{39}$ , em que  $X_{33}$  é T ou Y;  $X_{34}$  é Y, N, R, F, G, S, ou T;  $X_{35}$  é A, P, S, F, H, N, ou R;  $X_{36}$  é A;  $X_{37}$  é H, L, R, V, N, D, F, ou I;  $X_{38}$  é L, G, M, F, I, ou V; e  $X_{39}$  é H, e a alça FG tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{41}$ - $X_{42}$ - $X_{43}$ - $X_{44}$ - $X_{45}$ - $X_{46}$ - $X_{47}$ - $X_{48}$ - $X_{49}$ - $X_{50}$ , em que  $X_{41}$  é L ou I;  $X_{42}$  é S;  $X_{43}$  é K, R, A, G, S, H, N, T, ou P;  $X_{44}$  é S, A, E, H, K, ou N;  $X_{45}$  é K, Q, D, E, N, T, ou S;  $X_{46}$  é V, I, F, L, M, P, ou T;  $X_{47}$  é I ou Y;  $X_{48}$  é H, I, V, L, R, F, G, S, ou T;  $X_{49}$  é H; e  $X_{50}$  é M, L, R, ou V.

[0026] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que e a alça DE tem 1 substituição de aminoácido, tal como uma substituição de aminoácido conservadora, e a alça FG

tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 substituições de aminoácidos, tais como substituições de aminoácidos conservadoras. Em algumas modalidades, a alça DE tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G-X<sub>40</sub>, em que X<sub>40</sub> é L, e a alça FG tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>41</sub>-X<sub>42</sub>-X<sub>43</sub>-X<sub>44</sub>-X<sub>45</sub>-X<sub>46</sub>-X<sub>47</sub>-X<sub>48</sub>-X<sub>49</sub>-X<sub>50</sub>, em que X<sub>41</sub> é L ou I; X<sub>42</sub> é S; X<sub>43</sub> é K, R, A, G, S, H, N, T, ou P; X<sub>44</sub> é S, A, E, H, K, ou N; X<sub>45</sub> é K, Q, D, E, N, T, ou S; X<sub>46</sub> é V, I, F, L, M, P, ou T; X<sub>47</sub> é I ou Y; X<sub>48</sub> é H, I, V, L, R, F, G, S, ou T; X<sub>49</sub> é H; e X<sub>50</sub> é M, L, R, ou V.

[0027] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça BC tem 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições de aminoácidos, tais como substituições de aminoácidos conservadoras, e a alça DE tem 1 substituição de aminoácido, tal como uma substituição de aminoácido conservadora, e a alça FG tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 substituições de aminoácidos, tais como substituições de aminoácidos conservadoras. Em algumas modalidades, a alça BC tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>33</sub>-L-P-X<sub>34</sub>-X<sub>35</sub>-X<sub>36</sub>-X<sub>37</sub>-X<sub>38</sub>-X<sub>39</sub>, em que X<sub>33</sub> é T ou Y; X<sub>34</sub> é Y, N, R, F, G, S, ou T; X<sub>35</sub> é A, P, S, F, H, N, ou R; X<sub>36</sub> é A; X<sub>37</sub> é H, L, R, V, N, D, F, ou I; X<sub>38</sub> é L, G, M, F, I, ou V; e X<sub>39</sub> é H; a alça DE tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G-X<sub>40</sub>, em que X<sub>40</sub> é L; e a alça FG tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>41</sub>-X<sub>42</sub>-X<sub>43</sub>-X<sub>44</sub>-X<sub>45</sub>-X<sub>46</sub>-X<sub>47</sub>-X<sub>48</sub>-X<sub>49</sub>-X<sub>50</sub>, em que X<sub>41</sub> é L ou I; X<sub>42</sub> é S; X<sub>43</sub> é K, R, A, G, S, H, N, T, ou P; X<sub>44</sub> é S, A, E, H, K, ou N; X<sub>45</sub> é K, Q, D, E, N, T, ou S; X<sub>46</sub> é V, I, F, L, M, P, ou T; X<sub>47</sub> é I ou Y; X<sub>48</sub> é H, I, V, L, R, F, G, S, ou T; X<sub>49</sub> é H; e X<sub>50</sub> é M, L, R, ou V.

[0028] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, e tem substituições de aminoácidos nas alças BC, DE,

e FG que permitem que o polipeptídeo mantenha ligação com a miostatina. Tais substituições de aminoácidos podem ser determinadas por, por exemplo, varredura mutacional profunda como descrito no Exemplo 8. Conseqüentemente, em algumas modalidades, o polipeptídeo tem uma alça BC compreendendo uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ , em que:  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{52}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L, M, e V;  $X_{53}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, e Y;  $X_{54}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{56}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em G e S;  $X_{57}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{58}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, G, L, M, S, e T; e  $X_{59}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, H, N, P, Q, R, S, e Y. Em uma modalidade preferida,  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, S, V, W, e Y;  $X_{52}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L;  $X_{53}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em P;  $X_{54}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{56}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em G;  $X_{57}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, e Y;  $X_{58}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, L, M, e S; e  $X_{59}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, H, N, Q, S, e Y. Em uma modalidade mais preferida,  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, S, e W;  $X_{52}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L;  $X_{53}$  é selecionado a partir do grupo consistindo

em P; X<sub>54</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>55</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, e Y; X<sub>56</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em G; X<sub>57</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, H, K, L, M, N, R, V, W, e Y; X<sub>58</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, e L; e X<sub>59</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em H, N, e Q. Em uma modalidade específica, X<sub>51</sub> S; X<sub>52</sub> é L; X<sub>53</sub> é P; X<sub>54</sub> é H; X<sub>55</sub> é Q; X<sub>56</sub> é G; X<sub>57</sub> é K; X<sub>58</sub> é A; X<sub>59</sub> é N.

[0029] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma alça DE compreendendo uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G-X<sub>60</sub>, em que X<sub>60</sub> é A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T, e V. Em uma modalidade preferida, X<sub>60</sub> é C, E, I, L, M, Q, T, e V. Em uma modalidade mais preferida, X<sub>60</sub> é C, E, I, L, M, e V. Em uma modalidade específica, X<sub>60</sub> é V.

[0030] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma alça FG compreendendo uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>61</sub>-X<sub>62</sub>-X<sub>63</sub>-X<sub>64</sub>-X<sub>65</sub>-X<sub>66</sub>-X<sub>67</sub>-X<sub>68</sub>-X<sub>69</sub>-X<sub>70</sub>, em que X<sub>61</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W, e Y; X<sub>62</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>63</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>64</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>65</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>66</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W, e Y; X<sub>67</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>68</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>69</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em F,

W, e Y; e  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y. Em uma modalidade preferida,  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, I, L, M, e V;  $X_{62}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, L, M, P, T, V, W, e Y;  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, e Y;  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, e V. Em uma modalidade mais preferida,  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em I e V;  $X_{62}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, L, M, T, V, W, e Y;  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, e V;  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, S, T, e W;  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, I, V, W, e Y;  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, H, I, L, M, V, W, e Y;  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, G, I, K, L, M, T, V, e W;  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, K, L, M, P, Q, e R. Em uma modalidade específica,  $X_{61}$  é V;  $X_{62}$  é T;  $X_{63}$  é D;  $X_{64}$  é T;  $X_{65}$  é G;  $X_{66}$  é Y;  $X_{67}$  é L;  $X_{68}$  é K;  $X_{69}$  é Y; e  $X_{70}$  é K.

[0031] Em algumas modalidades, o polipeptídeo da invenção compreende alças BC, DE, e FG, em que a alça BC compreende uma

sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ , em que,  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{52}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L, M, e V;  $X_{53}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, e Y;  $X_{54}$  é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{56}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em G e S;  $X_{57}$  é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{58}$  é A, C, G, L, M, S, e T; e  $X_{59}$  é A, C, F, H, N, P, Q, R, S, e Y; a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $G-R-G-X_{60}$ , em que  $X_{60}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T, e V; e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ , em que  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W, e Y;  $X_{62}$  é A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W, e Y;  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, W, e Y; e  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y.

[0032] Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo da invenção compreende alças BC, DE, e FG, em que a alça BC compreende uma

sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{51}$ - $X_{52}$ - $X_{53}$ - $X_{54}$ - $X_{55}$ - $X_{56}$ - $X_{57}$ - $X_{58}$ - $X_{59}$ , em que,  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, S, V, W, e Y;  $X_{52}$  é L;  $X_{53}$  é P;  $X_{54}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{56}$  é G;  $X_{57}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, e Y;  $X_{58}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, L, M, e S; e  $X_{59}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, H, N, Q, S, e Y; a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G- $X_{60}$ , em que  $X_{60}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, E, I, L, M, Q, T, e V; e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{61}$ - $X_{62}$ - $X_{63}$ - $X_{64}$ - $X_{65}$ - $X_{66}$ - $X_{67}$ - $X_{68}$ - $X_{69}$ - $X_{70}$ , em que  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, I, L, M, e V;  $X_{62}$  é C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, L, M, P, T, V, W, e Y;  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, e Y;  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y.

[0033] Em uma modalidade mais preferida, o polipeptídeo da invenção compreende alças BC, DE, e FG, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{51}$ - $X_{52}$ - $X_{53}$ - $X_{54}$ - $X_{55}$ - $X_{56}$ - $X_{57}$ - $X_{58}$ - $X_{59}$ , em que,  $X_{51}$  é selecionado a partir

do grupo consistindo em F, S, e W;  $X_{52}$  é L;  $X_{53}$  é P;  $X_{54}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, e Y;  $X_{56}$  é G;  $X_{57}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, H, K, L, M, N, R, V, W, e Y;  $X_{58}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, e L; e  $X_{59}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em H, N, e Q; a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G- $X_{60}$ , em que  $X_{60}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, E, I, L, M, e V; e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{61}$ - $X_{62}$ - $X_{63}$ - $X_{64}$ - $X_{65}$ - $X_{66}$ - $X_{67}$ - $X_{68}$ - $X_{69}$ - $X_{70}$ , em que  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em I e V;  $X_{62}$  é C, F, I, L, M, T, V, W, e Y;  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, e V;  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, S, T, e W;  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, I, V, W, e Y;  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, H, I, L, M, V, W, e Y;  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, G, I, K, L, M, T, V, e W;  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, K, L, M, P, Q, e R.

[0034] Em uma modalidade específica, o polipeptídeo da invenção compreende alças BC, DE, e FG, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{51}$ - $X_{52}$ - $X_{53}$ - $X_{54}$ - $X_{55}$ - $X_{56}$ - $X_{57}$ - $X_{58}$ - $X_{59}$ , em que,  $X_{51}$  é S;  $X_{52}$  é L;  $X_{53}$  é P;  $X_{54}$  é H;  $X_{55}$  é Q;  $X_{56}$  é G;  $X_{57}$  é K;  $X_{58}$  é A;  $X_{59}$  é N; a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G- $X_{60}$ , em que  $X_{60}$  é V; e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{61}$ - $X_{62}$ - $X_{63}$ - $X_{64}$ - $X_{65}$ - $X_{66}$ - $X_{67}$ - $X_{68}$ - $X_{69}$ - $X_{70}$ , em que  $X_{61}$  é V;  $X_{62}$  é T;  $X_{63}$  é D;  $X_{64}$  é T;  $X_{65}$  é G;  $X_{66}$  é Y;  $X_{67}$  é L;  $X_{68}$  é K;  $X_{69}$  é Y; e  $X_{70}$  é K.

[0035] Em outra modalidade, o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 273 [PRD-1474], SEQ ID NO: 118 [3116\_A06], SEQ ID NO: 281 [Sequência de Adnectina núcleo de PRD-1474 e 3116\_A06 precedida pela sequência de extensão N-terminal (GVSDVPRDL) e seguido por um C-terminal cauda (EI)] ou SEQ ID NO: 331 [Sequência de Adnectina núcleo de PRD-1474 e 3116\_A06 sem uma sequência líder N-terminal ou de cauda C-terminal]. Em ainda outra modalidade, o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% idêntica às regiões sem alça BC, DE e FG de SEQ ID NO: 118, 273, 281, ou 331.

[0036] Em um outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos que se ligam a um sítio de ligação de Adnectina descontínua na miostatina. Em algumas modalidades, os polipeptídeos se ligam uma região dentro dos aminoácidos 55-66 da miostatina (SEQ ID NO: 3). Em algumas modalidades, os polipeptídeos se ligam uma região dentro dos aminoácidos 85-101 de miostatina (SEQ ID NO: 3). Em ainda outras modalidades, os polipeptídeos ligam-se dentro de duas regiões, aminoácidos 85-101 e 55-66, de miostatina (SEQ ID NO: 3).

[0037] Em algumas modalidades, os polipeptídeos da invenção não competem para a ligação a miostatina com ActRIIB. Em algumas modalidades, os polipeptídeos da invenção competem para a ligação a miostatina com ALK4 e/ou ALK5.

[0038] Em algumas modalidades, os polipeptídeos descritos acima podem compreender uma ou mais porções farmacocinéticas (PK) tais como polietileno glicol, ácido siálico, Fc, fragmento Fc, transferrina, albumina sérica, uma proteína de ligação de albumina sérica, e uma proteína de ligação de imunoglobulina do soro. Em uma modalidade, a

porção PK é uma proteína de ligação de albumina do soro que compreende um domínio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que se liga a, por exemplo, HSA. Em uma outra modalidade, a porção PK é Fc e pode estar em qualquer extremidade N ou C-terminal do polipeptídeo, e opcionalmente formar um dímero. Em ainda outras modalidades, a porção PK é polietileno glicol. Em algumas modalidades, a porção PK e polipeptídeo estão ligados através de pelo menos uma ligação dissulfureto, uma ligação peptídica, um polipeptídeo, um açúcar polimérico ou uma porção de polietilenoglicol.

[0039] Em um outro aspecto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo descrito acima, que é opcionalmente isento de endotoxina.

[0040] Em um outro aspecto, a invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica um polipeptídeo descrito acima, um vetor de expressão compreendendo uma sequência de nucleotídeos, e uma célula que compreende o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo. Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de produzir o polipeptídeo antimiostatina por cultura da célula.

[0041] Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de atenuação ou inibição de uma doença ou distúrbio relacionado com a miostatina em um indivíduo por administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo ou composição que compreende um polipeptídeo descrito acima. Em algumas modalidades, a doença a ser tratada é a distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica, miosite de corpos de inclusão (IBM), doença pulmonar obstrutiva congestiva, insuficiência cardíaca crônica, câncer, AIDS, insuficiência renal, doença renal crônica, uremia, artrite reumatóide, sarcopenia, desperdício muscular devido ao repouso absoluto prolongado, lesão da medula espinhal, acidente vascular cerebral, fratura óssea, envelhecimento, diabetes,

obesidade, hiperglicemia, caquexia, osteoartrite, osteoporose, enfarte do miocárdio, ou fibrose.

[0042] Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de atenuação ou inibição de um distúrbio associado com a degeneração ou atrofia dos músculos em um paciente.

[0043] Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de administração do polipeptídeo para aumentar a massa muscular, aumentar o número de células musculares, aumentar o tamanho das células musculares, aumentar a força muscular, o desempenho físico e/ou resistência no indivíduo.

[0044] Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de atenuação ou inibição de um distúrbio metabólico em um indivíduo. Em algumas modalidades, o distúrbio metabólico é diabetes (por exemplo, diabetes do tipo II), hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, resistência à insulina, metabolismo deficiente da glicose, lipodistrofia, obesidade, ou síndrome metabólica. Em algumas modalidades, uma segunda composição terapêutica pode ser administrada. Em outras modalidades, a administração dos resultados polipeptídicos em um aumento da sensibilidade à insulina, aumento da captação de glicose pelas células, uma diminuição dos níveis de glicose no sangue, e/ou diminuição da gordura corporal.

[0045] Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método para aumentar a massa muscular magra em um indivíduo, que compreende administrar uma quantidade eficaz de um polipeptídeo ou composição descrita acima.

[0046] Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método para aumentar a proporção de massa muscular magra para gorda em um indivíduo, que compreende administrar uma quantidade eficaz de um polipeptídeo ou composição descrita acima.

[0047] Em um outro aspecto, a invenção proporciona kits que

compreendem um polipeptídeo ou composição descrita acima, e as instruções para utilização.

[0048] Em um outro aspecto, a invenção proporciona métodos de detecção ou medição da miostatina em uma amostra que compreende contatar a amostra com um polipeptídeo acima descrito, e detectar ou medir a ligação do polipeptídeo a miostatina.

[0049] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a Adnectinas de ligação antimioestatina para utilização na atenuação ou inibição de uma doença ou distúrbio relacionado com a miostatina, atenuação ou inibição de um distúrbio associado com a degeneração ou atrofia dos músculos, aumento da massa muscular, aumento do número células musculares, aumento do tamanho das células musculares, aumento da força muscular, desempenho físico e/ou resistência, atenuação ou inibição de um distúrbio metabólico, aumento da massa muscular magra, e/ou aumento da relação entre a massa muscular magra para gorda, em um indivíduo. Em algumas modalidades, as Adnectinas antimioestatina são aquelas descritas, por exemplo, as Adnectinas antimioestatina estabelecidas em SEQ ID NOs: 80-123, 228-239, e 252-273.

[0050] Em um outro aspecto, a invenção refere-se com a utilização das Adnectinas de ligação antimioestatina para a preparação de um medicamento para atenuar ou inibir uma doença ou distúrbio relacionado com a miostatina, atenuação ou inibição de uma distúrbio associado com a degeneração ou atrofia dos músculos, aumento da massa muscular, aumento do número de células musculares, aumento do tamanho das células musculares, aumento da força muscular, desempenho físico e/ou resistência, atenuação ou inibição de um distúrbio metabólico, aumento da massa muscular magra, e/ou aumento da relação entre a massa muscular magra para gorda, em um indivíduo. Em algumas modalidades, as Adnectinas antimioestatina são aquelas

descritas, por exemplo, as Adnectinas antimioestatina estabelecidas em SEQ ID NOs: 80-123, 228-239, e 252-273.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0051] A Figura 1 mostra um alinhamento de sequências de aminoácidos de Adnectina antimioestatina exemplares. As sequências de aminoácidos de alça BC, DE, e FG são identificadas por sublinhando, itálico / sublinhado ou negrito / sublinhado, respectivamente.

[0052] A Figura 2 representa uma análise baseada em WebLogo dos resíduos variados da alça BC da família de Adnectinas antimioestatina 1979\_B06. Indicada é a frequência de aminoácidos em cada posição da alça BC que variaram durante PROfusão. A imagem foi criada usando WebLogo (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A Sequência logo generator. *Genome Research* 2004; 14:1188-1190).

[0053] A Figura 3 representa uma análise baseada em WebLogo dos resíduos variados da alça DE da família de Adnectinas antimioestatina 1979\_B06. Indicada é a frequência de aminoácidos em cada posição da alça DE que variaram durante profusão.

[0054] A Figura 4 representa uma análise baseada em WebLogo dos resíduos variados da alça FG da família de Adnectinas antimioestatina 1979\_B06. Indicada é a frequência de aminoácidos em cada posição da alça FG que variaram durante profusão.

[0055] A Figura 5 representa uma análise baseada em WebLogo dos resíduos variados da alça BC da família de Adnectinas antimioestatina 2062\_G02. Indicada é a frequência de aminoácidos em cada posição da alça BC que variaram durante profusão.

[0056] A Figura 6 representa uma análise baseada em WebLogo dos resíduos variados da alça DE da família de Adnectinas antimioestatina 2062\_G02. Indicada é a frequência de aminoácidos em cada posição da alça DE que variaram durante profusão.

[0057] A Figura 7 representa uma análise baseada em WebLogo dos resíduos variados da alça FG da família de Adnectinas antimiostatina 2062\_G02. Indicada é a frequência de aminoácidos em cada posição da alça FG que variaram durante profusão.

[0058] A Figura 8 representa um gráfico que mostra a correlação dos dados bioquímicos e baseados em células para as proteínas mutantes de alanina discretas de Adnectina 3116\_A06, com a sua aptidão relativa em varredura mutacional profunda de acordo com a posição da sequência.

[0059] A Figura 9 representa um gráfico que mostra a correlação de  $ER^{norm}$  a partir de varredura mutacional profunda de NGS de mutações de alanina de Adnectina 3116\_A06 com o IC50 medido por HTRF. Faixas são mutações no sítio único preferíveis, mais preferíveis, e a mais preferível para ligação a miostatina.

[0060] A Figura 10 representa um gráfico de um ensaio de ligação competitiva (ELISA competitivo) que mostra que Adnectinas PRD-1285, PRD-1286, e PRD-1288 não bloqueia ligação de miostatina a ActRIIb-Fc. Indicada é a % de competição de ligação ActRIIb-Fc a miostatina. Como esperado, o construto ActRIIb-Fc de controle positivo competiu com a ligação de ActRIIb-Fc a miostatina.

[0061] A Figura 11 representa um gráfico que mostra os efeitos de várias concentrações de Adnectinas PRD-1285, PRD-1286, e PRD-1288 na atividade de miostatina em um ensaio ARE-luciferase. As condições experimentais são como descritas no Exemplo 3. Cada uma PRD-1285, PRD-1286, e PRD-1288 inibiu 100% da atividade ARE-luciferase induzida por miostatina.

[0062] A Figura 12 é um diagrama esquemático que descreve o mecanismo de ação pelo qual as Adnectinas da presente invenção inibem a atividade da miostatina. O complexo de sinalização nativo é mostrado na Fig. 12A. Especificamente, a ligação de miostatina a

ActRIIb é seguido por recrutamento de quinase 4 tipo receptor activina (ALK4) ou ligação de ALK5 e ActRIIb e ALK4/5 a regiões distintas da miostatina. As Adnectinas da presente invenção impedem a ligação de ALK4/5, mas não ActRIIb, a miostatina (Fig. 12B).

[0063] A Figura 13 mostra um modelo computacional que descreve o complexo de 3116\_A06 e miostatina. Fig. 13A mostra a estrutura da miostatina sozinha (cinza), com os sítios de ligação de ALK4 e sítios de ligação de ActRIIB indicados. As regiões onde 3116\_A06 se liga a miostatina (ou seja, as regiões 1 e 2) são indicadas em preto, como determinado a partir de experiências descritas no Exemplo 11. A Fig. 13B mostra um complexo preferido de 3116\_A06 (preto) e miostatina (cinza) derivado de um protocolo de ancoragem tal como descrito no Exemplo 12. Regiões de miostatina 1 e 2, como identificadas por HDX-MS (Exemplo 11) estão representadas no espaço de enchimento de um lado da molécula apenas, e as alças BC, DE, e FG de 3116\_A06 estão representados na renderização em vara. Embora esta figura mostre uma Adnectina ligada a um dos dois sítios de ligação de Adnectina, deve ser notado que um ou outro sítio de ligação de Adnectina individual, ou ambos os sítios de ligação de Adnectina, poderiam ser ocupados.

[0064] A Figura 14 representa um gráfico de barras que mostra aumentos percentuais em peso corporal no dia 15 em camundongos tratados com as Adnectinas antimioestatina indicadas em comparação com camundongos de controle. Camundongos SCID B6 foram tratados semanalmente ou quinzenalmente com injeções subcutâneas de Adnectinas antimioestatina durante 14 dias, como descrito no Exemplo 13. Pesos corporais foram medidos ao longo do período de tratamento; valores calculados variação percentual para o dia 15 estão representados. (\* = Indica diferenças estatísticas de respectivo grupo controle;  $p \leq 0,01$  t-teste).

[0065] A Figura 15 representa um gráfico de barras que mostra o

aumento de volume do músculo da perna (em cm<sup>3</sup>) no dia 15 em camundongos tratados com as Adnectinas antimioestatina indicadas em comparação com camundongos de controle. Camundongos SCID B6 foram tratados semanalmente ou quinzenalmente com injeções subcutâneas de Adnectinas antimioestatina durante 14 dias tal como descrito no Exemplo 13. (\* = indica diferenças estatisticamente respectivo grupo de controle;  $p \leq 0,05$  t-teste).

[0066] A Figura 16 representa um gráfico de barras que mostra o aumento de volume do músculo da perna (em cm<sup>3</sup>) no dia 28 em camundongos tratados com as várias doses indicadas de PRD-1474. Camundongos SCID B6 foram tratados semanalmente ou quinzenalmente com injeções subcutâneas de PRD-1474 durante 28 dias tal como descrito no Exemplo 14. (\*  $p < 0,0001$ ; # não significativa entre os grupos).

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

### **Definições**

[0067] A menos que definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o normalmente entendido por um versado na técnica. Embora quaisquer métodos e composições semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática ou no teste da presente invenção, os métodos preferidos e composições são aqui descritos.

[0068] "Miostatina de comprimento completo", tal como aqui utilizado refere-se a uma sequência de polipeptídeo de comprimento completo descrito em McPherron et al. (1997), supra, bem como polipeptídeos de comprimento completo relacionados incluindo variantes alélicas e interespécies homólogas. O termo "miostatina" ou "miostatina madura" refere-se a fragmentos da miostatina madura biologicamente ativa, bem como polipeptídeos relacionados incluindo variantes alélicas, variantes de junção, e peptídeos e polipeptídeos de

fusão. A proteína C-terminal madura foi relatada para ter 100% de identidade de sequência entre muitas espécies, incluindo humano, camundongo, galinha, porcino, peru, e rato (Lee et al., *PNAS* 2001; 98: 9306). A sequência para prepromiostatina humana é:

[0069] MQKLQLCVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCN  
ACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELI  
DQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKC  
CFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTR  
YTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNWLLKQPESNLGIEIKALDEN  
GHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTES  
RCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVFLQKYPHTH  
LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDR  
GCS (SEQ ID NO: 1)

[0070] A sequência para pro-miostatina humana é:

[0071] NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSK  
LRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDY  
HATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIY  
LRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSID  
VKTVLQNWLLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLE  
VKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIA  
PKRYKANYCSGECEVFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMS  
PINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 2)

[0072] A sequência para miostatina madura (conservada em humano, murino, rato, galinha, peru, cão, cavalo, e porco) é:

[0073] DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRY  
KANYCSGECEVFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPIN  
MLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 3).

[0074] "Polipeptídeo" tal como aqui utilizado refere-se a qualquer sequência de dois ou mais aminoácidos, independentemente do comprimento, modificação pós-tradução, ou função. "Polipeptídeo",

"peptídeo" e "proteína" são aqui utilizados indiferentemente. Os polipeptídeos podem incluir aminoácidos naturais e aminoácidos não naturais, tais como os descritos na Pat. No. 6.559.126, aqui incorporada por referência. Os polipeptídeos também podem ser modificados de qualquer de uma variedade de formas químicas convencionais (por exemplo, um aminoácido pode ser modificado com um grupo protetor; o aminoácido carbóxi-terminal pode ser feito em um grupo amida terminal; o resíduo amino-terminal pode ser modificado com grupos para, por exemplo, aumentar a lipofilicidade; ou o polipeptídeo pode ser quimicamente glicosilado ou de outra maneira modificado para aumentar a estabilidade ou meia-vida in vivo). Modificações polipeptídicas podem incluir a fixação de uma outra estrutura, tal como um composto cíclico ou outra molécula para o polipeptídeo e também pode incluir polipeptídeos que contêm um ou mais aminoácidos em uma configuração alterada (isto é, R ou S; ou, L ou D). Os peptídeos da invenção são proteínas derivadas do décimo domínio de fibronectina de tipo III que foram modificadas para se ligar a miostatina e são aqui referidas como "Adnectina antimioestatina" ou "Adnectina de miostatina".

[0075] Uma "cadeia de polipeptídeo", como aqui utilizada, refere-se a um polipeptídeo, em que cada um dos domínios da mesma é unido a outro domínio (s) de ligação (ões) peptídica, ao contrário de interações não covalentes ou ligações de dissulfureto.

[0076] Um polipeptídeo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que iriam interferir com as utilizações de diagnóstico ou terapêuticas destinadas ao polipeptídeo, e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteicos ou não proteicos. Em modalidades preferidas, o polipeptídeo será purificado (1) até mais de 95% por peso de polipeptídeo, tal como determinado pelo método de Lowry, e mais

preferivelmente mais do que 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos os resíduos da sequência de aminoácidos N-terminal ou interna por utilização de um sequenciador de copo rotativo, ou (3) para homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras utilizando azul de Coomassie ou, de preferência, coloração prata. O polipeptídeo isolado inclui o polipeptídeo in situ dentro de células recombinantes uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do polipeptídeo não estará presente. Comumente, contudo, o polipeptídeo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

[0077] "Percentagem (%)" de identidade de sequência de aminoácidos" é aqui definida como a percentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos em uma sequência selecionada, após alinhamento das sequências e introdução de intervalos, se necessário, para alcançar a identidade de sequência percentual máxima, e não considerando quaisquer substituições conservadoras como parte da identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinação de percentual da identidade de sequência de aminoácidos pode ser conseguido de várias formas que estão dentro da perícia na técnica, por exemplo, utilizando programas de computador disponíveis publicamente tais como os programas de software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 ou Megalign (DNASTAR™). Os versados na técnica podem prontamente determinar os parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para conseguir o alinhamento máximo ao longo do comprimento total das sequências a ser comparada. Por exemplo, a % de identidade de sequência de aminoácido de uma dada sequência de aminoácidos A a, com, ou contra uma dada sequência de aminoácidos B (que pode ser alternativamente escrita como uma dada sequência de aminoácidos A

que tem ou compreende uma determinada % de identidade de sequência de aminoácido a, com, ou contra uma dada sequência de aminoácidos B) é calculada como se segue: 100 vezes a fração X/Y onde X é o número de resíduos de aminoácido pontuados como correspondências idênticas pelo programa de alinhamento de sequência ALIGN-2 naquele alinhamento do programa de A e B, e onde Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Será apreciado que quando o comprimento da sequência de aminoácidos A não é igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, a % de identidade de sequência de aminoácido de A para B não será igual a % de identidade de sequência de aminoácido de B para A.

[0078] Tal como aqui utilizado, "substituição conservadora" designa a substituição de um resíduo de aminoácido por outro, sem alterar a conformação total e função do peptídeo, incluindo, mas não limitado a, a substituição de um aminoácido por um que possua propriedades semelhantes (tais como, por exemplo, a polaridade, o potencial de ligação de hidrogênio, ácido, base, forma, hidrofóbico, aromático, e semelhantes). Os aminoácidos com propriedades semelhantes são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, arginina, histidina e lisina são aminoácidos básicos hidrófilos e podem ser permutáveis. Da mesma forma, isoleucina, um aminoácido hidrofóbico, pode ser substituída por leucina, metionina ou valina. Aminoácidos hidrofílicos neutros, que podem ser substituídos uns pelos outros incluem, asparagina, glutamina, serina e treonina. Por "substituído" ou "modificado" a presente invenção inclui os aminoácidos que foram alterados ou modificados a partir de aminoácidos que ocorrem naturalmente. Como tal, deveria ser entendido que, no contexto da presente invenção, uma substituição conservadora é reconhecida na técnica como uma substituição de um aminoácido por outro aminoácido que tem propriedades semelhantes.

[0079] Tal como aqui utilizado, o termo "sítio de ligação de Adnectina" refere-se ao sítio ou porção de uma proteína (por exemplo, a miostatina) que interage ou se liga a uma determinada Adnectina (por exemplo, como um epítipo reconhecido por um anticorpo). Sítios de ligação de adnectina podem ser formados a partir de aminoácidos contíguos ou aminoácidos não contíguos justapostos por desdobramento terciário de uma proteína. Sítios de ligação de Adnectina formados por aminoácidos contíguos são tipicamente mantidos a exposição a solventes desnaturantes, enquanto que os sítios de ligação de Adnectina formadas por desdobramento terciário são tipicamente perdidos no tratamento de solventes desnaturantes.

[0080] Um sítio de ligação de Adnectina para uma Adnectina antimioestatina da invenção pode ser determinado por aplicação de técnicas convencionais, tipicamente utilizadas para mapeamento de epítipos de anticorpos incluindo, mas não se limitando a mapeamento de protease e análise mutacional. Alternativamente, um sítio de ligação de Adnectina pode ser determinado por ensaio de competição usando uma Adnectina de referência ou anticorpo que se liga ao mesmo polipeptídeo, por exemplo, a miostatina (conforme descrito infra mais detalhadamente na seção "Adnectinas de competição cruzada e/ou Adnectinas que se ligam ao mesmo Sítio de ligação de Adnectina". Se a Adnectina teste e a molécula de referência (por exemplo, um outro anticorpo ou Adnectina) competem, em seguida, elas ligam-se ao mesmo sítio de ligação de Adnectina ou a ou sítios de ligação de Adnectina suficientemente proximais tais que a ligação de uma molécula interfere com a outra.

[0081] Os termos "liga-se especificamente", "ligação específica", "ligação seletiva", e "liga-se seletivamente", como aqui indiferentemente utilizados refere-se a uma Adnectina que apresenta uma afinidade para a miostatina, mas não se liga de forma significativa (por exemplo, menos

do que cerca de 10 % de ligação) a um polipeptídeo diferente, conforme medido por uma técnica disponível na área, tais como, mas não limitada a, análise de Scatchard e/ou ensaios de ligação competitiva (por exemplo, ELISA de competição, ensaios BIACORE). O termo também é aplicável onde, por exemplo, um domínio de ligação de uma Adnectina da invenção é específico para a miostatina.

[0082] O termo "liga-se preferivelmente" como aqui utilizado refere-se à situação em que uma Adnectina da invenção se liga a miostatina pelo menos cerca de 20% mais do que se liga a um polipeptídeo diferente, conforme medido por uma técnica disponível na área, tais como, mas não limitados a, análise de Scatchard e/ou ensaios de ligação competitiva (por exemplo, a ELISA de competição, ensaio BIACORE).

[0083] Tal como aqui utilizado, o termo "reatividade cruzada" refere-se a uma Adnectina que se liga a mais do que uma proteína distinta que possui posições de ligação de Adnectina idênticos ou muito semelhantes.

[0084] O termo " $K^D$ ", "tal como aqui utilizado, destina-se a referir a constante de equilíbrio de dissociação de uma determinada interação de proteína Adnectina (por exemplo, a miostatina) ou a afinidade de uma Adnectina para uma proteína (por exemplo, a miostatina), como medido usando um ensaio de ressonância de plasmon de superfície ou um ensaio de ligação celular. Um "desejado  $K^D$ ", como aqui utilizado, refere-se a uma  $K_D$  de uma Adnectina que é suficiente para os fins previstos. Por exemplo, um desejado  $K_D$  pode referir-se a  $K_D$  de uma Adnectina requerida para desencadear um efeito funcional em um ensaio in vitro, por exemplo, um ensaio de luciferase baseado em células.

[0085] O termo " $k_{ass}$ ", tal como aqui utilizado, destina-se a referir a constante de velocidade de associação para a associação de uma Adnectina no complexo proteína / Adnectina.

[0086] O termo " $k_{\text{diss}}$ ", tal como aqui utilizado, destina-se a referir a constante de velocidade de dissociação para a dissociação de uma Adnectina do complexo proteína / Adnectina.

[0087] O termo " $IC_{50}$ ", tal como aqui utilizado, refere-se à concentração de uma Adnectina que inibe uma resposta, tanto em in vitro ou um ensaio in vivo, a um nível que é 50% da resposta inibidora máxima, ou seja, a meio caminho entre a resposta inibitória máxima e a resposta não tratada.

[0088] O termo "atividade da miostatina" como aqui utilizado refere-se a uma ou mais das atividades morfogénicas ou de regulação de crescimento associadas com a ligação da proteína ativa da miostatina a ActRIIb e o subsequente recrutamento de Alk4 ou Alq5. Por exemplo, a miostatina ativa é um regulador negativo da massa muscular esquelética. Miostatina ativa também pode modular a produção de enzimas específicas do músculo (por exemplo, a creatina quinase), estimular a proliferação de mioblastos, e modular a diferenciação de pré-adipócitos para adipócitos. A atividade da miostatina pode ser determinada usando métodos reconhecidos na técnica, tais como os aqui descritos.

[0089] As frases "inibir a atividade da miostatina" ou "antagonizar a atividade da miostatina" ou "antagonizar miostatina" são utilizadas indiferentemente para referir a capacidade das Adnectinas antimioestatina da presente invenção para neutralizar ou antagonizar uma atividade de miostatina in vivo ou in vitro. Os termos "inibir" ou "neutralizar" aqui utilizado em relação a uma atividade de uma Adnectina da invenção significa a capacidade de antagonizar substancialmente, proibir, impedir, restringir, diminuir, desorganizar, eliminar, parar, reduzir ou reverter, por exemplo, a progressão ou gravidade que está sendo inibida incluindo, mas não limitado a, uma atividade biológica ou propriedade, uma doença ou uma condição. A

inibição ou neutralização é, de preferência, pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou superior.

[0090] Por exemplo, uma Adnectina antimiostatina da invenção pode reduzir os níveis de miostatina biologicamente ativa normalmente encontrados em um indivíduo vertebrado, ou uma redução dos níveis circulantes de miostatina biologicamente ativa em indivíduos com doenças que resultam em níveis de circulação elevados de miostatina em circulação. A redução da atividade da miostatina pode ser determinada utilizando ensaios in vitro, por exemplo, ensaios de ligação, como aqui descrito. Alternativamente, uma redução na atividade da miostatina pode resultar em um aumento do peso corporal, massa muscular melhorada, aumento da força muscular, uma alteração na proporção de músculo de gordura, aumento da massa muscular sem gordura, um aumento no tamanho e/ou o número de células musculares, e/ou uma redução no teor de gordura corporal.

[0091] O termo "PK" é um acrônimo para "farmacocinético" e abrange propriedades de um composto, incluindo, a título de exemplo, absorção, distribuição, metabolismo, e eliminação por um indivíduo. Uma "proteína modulação PK" ou "porção PK", tal como aqui utilizado refere-se a qualquer proteína, peptídeo, ou uma fração que afeta as propriedades farmacocinéticas de uma molécula biologicamente ativa, quando fundida com ou administrada em conjunto com a molécula biologicamente ativa. Exemplos de uma proteína modulação PK ou porção PK incluem PPOR EXEMPLO, aglutinantes de albumina do soro humano (HSA) (tais como os descritos na Publicação US Nos. 2005/0287153 e 2007/0003549, Publicação PCT Nos. WO 2009/083804 e WO 2009/133208), albumina de soro humano, Fc ou fragmentos de Fc e suas variantes, e açúcares (por exemplo, ácido siálico).

[0092] A "meia-vida" de uma sequência de aminoácidos ou composto pode geralmente ser definida como o tempo necessário para

a concentração sérica do polipeptídeo a ser reduzida em 50%, in vivo, por exemplo, devido à degradação da sequência ou composto e/ou separação ou sequestro da sequência ou composto por mecanismos naturais. A meia-vida pode ser determinada de qualquer modo conhecido per se, tal como por análise farmacocinética. Técnicas adequadas serão evidentes para o versado na técnica, e podem, por exemplo, envolver geralmente as etapas de adequadamente administrar a um indivíduo uma dose adequada da sequência de aminoácidos ou composto da invenção; coletar amostras de sangue ou outras amostras do indivíduo em intervalos regulares; determinar o nível ou concentração da sequência de aminoácidos ou composto da invenção na referida amostra de sangue; e calcular, a partir dos (um esquema de) dados assim obtidos, o tempo até que o nível ou a concentração da sequência de aminoácidos ou composto da invenção tenha sido reduzido em 50% em comparação com o nível inicial após administração. A referência é, por exemplo, feita aos manuais convencionais, tais como Kenneth, A. et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al., Pharmacokinete Analysis: A Practical Approach* (1996). Referência é também feita a Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics*, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982).

[0093] A meia-vida pode ser expressa usando parâmetros tais como o  $t_{1/2}$ -alfa,  $t_{1/2}$ -beta, HL\_Lambda\_z, e a área sob a curva (AUC). Na presente especificação, um "aumento da meia-vida" refere-se a um aumento em qualquer um destes parâmetros, quaisquer dois destes parâmetros, quaisquer três destes parâmetros, ou todos os quatro destes parâmetros. Um "aumento da meia-vida" refere-se, em particular, a um aumento na  $t_{1/2}$ -beta, e/ou HL\_Lambda\_z, com ou sem um aumento na  $t_{1/2}$ -alfa e/ou a AUC ou ambos.

[0094] As notações "mpk", "mg/kg" ou "mg por kg" referem-se a

miligramas por quilograma. Todas as notações são utilizadas alternadamente ao longo da presente divulgação.

[0095] Os termos "indivíduo", "sujeito" e "paciente", aqui utilizados alternadamente, referem-se a um animal, preferivelmente um mamífero (incluindo um primata e um não primata) ou espécies de aves, incluindo, mas não limitados a, murídeos, símios, seres humanos, animais de fazenda mamíferos (por exemplo, bovinos, suínos, ovinos), animais de esporte mamíferos (por exemplo, equino), e animais de estimação mamíferos (por exemplo, caninos e felinos); de preferência, o termo refere-se a seres humanos. O termo também se refere a espécies aviárias, incluindo, mas não limitadas a, galinhas e perus. Em uma determinada modalidade, o indivíduo, de preferência um mamífero, preferivelmente um ser humano, é ainda caracterizado por uma doença ou distúrbio ou condição que iria se beneficiar de uma diminuição do nível ou diminuição da bioatividade de miostatina. Em uma outra modalidade o indivíduo, de preferência um mamífero, preferivelmente um ser humano, é ainda caracterizado como estando em risco de desenvolver um distúrbio, doença ou condição que poderia se beneficiar de uma diminuição do nível de miostatina ou uma diminuição da bioatividade da miostatina.

[0096] O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a, pelo menos, a dose mínima, mas inferior a uma dose tóxica, de um agente que é necessário para conferir um benefício terapêutico a um indivíduo. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma Adnectina antimioestatina da invenção é uma quantidade que em mamíferos, de preferência seres humanos, resulta em um ou mais dos seguintes: um aumento no volume de músculo e/ou a força muscular, uma diminuição em gordura corporal, aumento da sensibilidade à insulina, ou o tratamento de condições em que a presença de miostatina provoca ou contribui para um efeito indesejável ou patológico uma

diminuição nos níveis de miostatina resulta em um efeito terapêutico benéfico.

[0097] O termo "frágil" ou "fragilidade" como aqui utilizado refere-se a uma condição que pode ser caracterizada por dois ou mais sintomas de fraqueza, perda de peso, diminuição da mobilidade, fadiga, baixos níveis de atividade, baixa resistência e resposta comportamental prejudicada a estímulos sensoriais. Uma característica de fragilidade é "sarcopenia", ou a perda relacionada com a idade de massa muscular.

[0098] O termo "caquexia" como aqui utilizado refere-se à condição de perda de massa muscular e perda acelerada da massa corporal magra que pode resultar de várias doenças.

### **Visão global**

[0099] A presente invenção proporciona novos polipeptídeos que se ligam e antagonizam a miostatina (aqui referida como "Adnectinas antimioestatina"). A fim de identificar os antagonistas de miostatina, a miostatina foi apresentada para grandes bibliotecas sintéticas de Adnectinas. Adnectinas que prendiam a miostatina foram selecionadas para a ligação da miostatina, para propriedades biofísicas, e para a atividade inibitória da miostatina. As Adnectinas antimioestatina foram mutadas e submetidas a uma pressão seletiva baixando a concentração alvo e selecionando Adnectinas antimioestatina com taxas lentas. A partir deste processo de otimização, uma família de Adnectinas foi identificada como inibidores específicos da miostatina com atividade bioquímica e biofísica favorável. As Adnectinas antimioestatina reveladas no presente pedido são úteis para o tratamento de distúrbios, doenças e condições para as quais a inibição da atividade da miostatina é conhecida por ser benéfica, incluindo, mas não se limitando a, o tratamento de doenças de desperdício muscular, distúrbios metabólicos e atrofia muscular devido à inatividade.

[00100] Conforme divulgado em Rebbapragada et al. (*MCB*

2003;23:7230-42), a via de sinalização da miostatina envolve a ligação de miostatina a ActRIIb, seguido por recrutamento de quinase 4 tipo receptor de activina (ALK4) ou ALK5. A ligação ao ALKs induz fosforilação de Smad2/Smad3, seguindo por ativação da via de sinalização de TGFP (vide, por exemplo, Rebbapragada et al., MCB 2003; 23: 7230-42).

### **Arcabouços Baseados em Fibronectina**

[00101] Um aspecto da aplicação fornece Adnectinas antimioestatina compreendendo um domínio Fn3 em que uma ou mais das alças acessíveis de solvente foram randomizado ou mutado. Em algumas modalidades, o domínio Fn3 é um domínio Fn3 derivado do décimo módulo do tipo selvagem do domínio de fibronectina de tipo III humano (<sup>10</sup>Fn3):

[00102] VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETG  
GNSPVOEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITVYAVTGRGDSPASSKP  
ISINYRT (SEQ ID NO: 4) (alças BC, DE e FG estão sublinhados).

[00103] Em outras modalidades, as sequências de ligação do não ligando de <sup>10</sup>Fn3, ou seja, o "arcabouço <sup>10</sup>Fn3", pode ser alterado, desde que o <sup>10</sup>Fn3 retenha a função de ligação do ligando e/ou a estabilidade estrutural. Uma variedade de arcabouços <sup>10</sup>Fn3 mutantes têm sido relatados. Em um aspecto, um ou mais de Asp 7, Glu 9, e Asp 23 é substituído por outro aminoácido, tal como, por exemplo, um resíduo de aminoácido não negativamente carregado (por exemplo, Asn, Lys, etc.). Estas mutações têm sido relatadas para ter o efeito de promover uma maior estabilidade do mutante de <sup>10</sup>Fn3 a pH neutro, em comparação com a forma de tipo selvagem (vide, por exemplo, Publicação PCT No. WO 02/04523). Uma variedade de alterações adicionais no arcabouço <sup>10</sup>Fn3 que é benéfica ou neutra foi divulgada. Vide, por exemplo, Batori et al., Protein Eng., 15(12):1015-1020 (December 2002); Koide et al., Biochemistry, 40(34):10326-10333 (Aug. 28, 2001).

[00104] Ambas proteínas <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> variante e do tipo selvagem são caracterizadas pela mesma estrutura, a saber, sete sequências de domínio de filamento beta designadas A a G e seis regiões de alça (Alça AB, alça BC, alça CD, alça DE, alça EF, e alça FG) que ligam as sete sequências de domínio de filamento beta. Os filamentos beta posicionados mais próximos do N- e C-terminal podem adotar uma conformação beta em solução. Em SEQ ID NO: 4, a alça AB corresponde aos resíduos 15-16, a alça BC corresponde aos resíduos 21-30, a alça CD corresponde aos resíduos 39-45, a alça DE corresponde aos resíduos 51-56, a alça EF corresponde aos resíduos 60-66, e a alça FG corresponde aos resíduos 76-87 (Xu et al., *Chemistry & Biology*, 9: 933-942, 2002).

[00105] Por conseguinte, em algumas modalidades, o Adnectina antimioestatina é um polipeptídeo <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> que é pelo menos 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, ou 90% idêntico ao domínio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> humano, mostrado em SEQ ID NO: 4. Muito da variabilidade irá geralmente ocorrer em uma ou mais das alças. Cada um dos beta ou filamentos tipo beta de um polipeptídeo <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> pode consistir essencialmente em uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à sequência de um beta ou filamento tipo beta correspondente da SEQ ID NO: 4, desde que tal variação não perturbe a estabilidade do polipeptídeo em condições fisiológicas.

[00106] Em algumas modalidades, a invenção proporciona uma Adnectina antimioestatina compreendendo um décimo domínio de fibronectina tipo III (<sup>10</sup>F<sub>n3</sub>), em que o domínio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> compreende uma alça AB; uma alça, BC; uma alça, CD; uma alça DE; uma alça EF; e uma alça FG; e tem pelo menos uma alça selecionada a partir das alças BC, DE e FG com uma sequência de aminoácidos alterada em relação à sequência da alça correspondente do domínio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> humano. Em

algumas modalidades, as Adnectinas antimioestatina da presente invenção compreendem um domínio  $^{10}\text{Fn3}$  que compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% idêntica às regiões de alça da SEQ ID NO: 4, em que pelo menos uma alça selecionada a partir de BC, DE e FG é alterado. Em algumas modalidades, as alças BC e FG são alteradas, e em algumas modalidades, as alças BC, DE, e FG são alterados, ou seja, os domínios  $^{10}\text{Fn3}$  compreendem as alças que não ocorrem naturalmente. Em algumas modalidades, as alças AB, CD e/ou EF são alterados. Por "alterados" significa uma ou mais alterações na sequência de aminoácidos em relação a uma sequência modelo (domínio de fibronectina humana correspondente) e inclui adições de aminoácido, deleções, substituições ou uma combinação dos mesmos. Alterar uma sequência de aminoácidos pode ser conseguido através de variação da sequência intencional, cega, ou espontânea, geralmente de uma sequência de codificação de ácido nucleico, e pode ocorrer através de qualquer técnica, por exemplo, PCR, PCR propensa a erros, ou síntese química de DNA.

[00107] Em algumas modalidades, uma ou mais alças selecionadas a partir de BC, DE e FG podem ser estendidos ou encurtados no comprimento em relação aa alça de fibronectina humana correspondente. Em algumas modalidades, o comprimento da alça pode ser prolongado em 2-25 aminoácidos. Em algumas modalidades, o comprimento da alça pode ser diminuído em 1-11 aminoácidos. Para otimizar a ligação ao antígeno, por conseguinte, a duração de um ciclo de  $^{10}\text{Fn3}$  pode ser alterada em comprimento, bem como na sequência para obter a maior flexibilidade e afinidade na ligação ao antígeno.

[00108] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende um domínio Fn3 que compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80, 85, 90, 95, 98, 99, ou 100% idêntica às regiões sem alça DE

SEQ ID NO: 4, em que pelo menos uma alça selecionada a parti de BC, DE e FG é alterado. Em algumas modalidades, a alça BC alterado tem até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácidos, até 1, 2, 3, ou 4 deleções de aminoácidos, até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 inserções de aminoácidos, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a alça DE alterado tem até 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições de aminoácidos, até 1, 2, 3, ou 4 deleções de aminoácidos, até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou 13 inserções de aminoácidos, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a alça FG tem um máximo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 substituições de aminoácidos, até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou 11 deleções de aminoácidos, até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 inserções de aminoácidos, ou uma combinação destes.

[00109] As Adnectinas antimiostatina da invenção baseiam-se em um arcabouço  $^{10}\text{Fn}3$  e são definidas em geral através da seguinte sequência:

[00110] EVVAAT(Z)<sub>a</sub>SLLI(Z)<sub>x</sub>YYRITYGE(Z)<sub>b</sub>QEFTV(Z)<sub>y</sub>ATI(Z)<sub>c</sub>DYTI TVYAV(Z)<sub>z</sub>ISINYRT (SEQ ID NO: 5),

[00111] em que a alça AB é representada por (Z)<sub>a</sub>, a alça CD é representada por (Z)<sub>b</sub>, a alça EF é representada por (Z)<sub>e</sub>, a alça BC é representada por (Z)<sub>x</sub>, a alça DE é representada por (Z)<sub>y</sub>, e a alça FG é representada por (Z)<sub>z</sub>. Z representa qualquer aminoácido e o subscrito após o símbolo Z representa um número inteiro do número de aminoácidos. Em particular, a pode estar em qualquer lugar de 1-15, 2-15, 1-10, 2-10, 1-8, 2-8, 1-5, 2-5, 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, ou 1-2 aminoácidos; e b, c, x, y e z podem ser cada um independentemente em qualquer lugar de 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7, 6-7 ou aminoácidos. Em modalidades preferidas, a é 2 aminoácidos, b é 7 aminoácidos, c é 7 aminoácidos, x é 11 aminoácidos,

y é 6 aminoácidos, e z é 12 aminoácidos. As sequências dos filamentos beta pode ocorrer em qualquer lugar de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, ou de 0 a 1 substituições, deleções ou adições de todas as 7 regiões de arcabouço relativamente aos aminoácidos correspondentes, mostrados na SEQ ID NO: 4. Em determinadas modalidades, as sequências dos filamentos beta pode ter lugar de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, ou de 0 a 1 substituições conservadoras em todas as 7 regiões de arcabouço relativamente aos aminoácidos correspondentes, mostrados na SEQ ID NO: 4. Em determinadas modalidades, os resíduos de aminoácidos básicos são fixos e quaisquer substituições, substituições conservadoras, deleções ou adições ocorrem em resíduos diferentes dos resíduos de aminoácidos do núcleo.

[00112] Alternativamente, as Adnectinas antimiostatina da presente invenção baseiam-se em um arcabouço  $^{10}Fn3$  e são definidas em geral pela sequência:

[00113] EVVAATPTSLI(Z)<sub>x</sub>YYRITYGETGGNSPVQEFTV(Z)<sub>y</sub>ATIS  
GLKPGVDYTITVYAV(Z)<sub>z</sub>ISINYRT (SEQ ID NO: 6)

[00114] em que a alça BC é representada por (Z)<sub>x</sub>, a alça DE é representada por (Z)<sub>y</sub>, e a alça FG é representada por (Z)<sub>z</sub>. Z representa qualquer aminoácido e o subscrito após o símbolo Z representa um número inteiro de o número de aminoácidos. Em particular, x, y e z podem ser cada um independentemente em qualquer lugar de 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7, ou 6-7 aminoácidos. Em modalidades preferidas, x é 11 aminoácidos, y é 6 aminoácidos, e z é 12 aminoácidos. As sequências dos filamentos beta pode ter lugar de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, ou de 0 a 1 substituições, deleções ou adições de todas as 7 regiões de arcabouço relativamente aos aminoácidos correspondentes, mostrados na SEQ ID NO: 1. Em certas modalidades, as sequências

dos filamentos beta pode ter lugar de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, ou de 0 a 1 substituições conservadoras em todas as 7 regiões de arcabouço relativamente aos aminoácidos correspondentes, mostrados na SEQ ID NO: 4. Em determinadas modalidades, os resíduos de aminoácidos básicos são fixos e quaisquer substituições, substituições conservadoras, deleções ou adições ocorrem em resíduos diferentes dos resíduos de aminoácidos do núcleo.

[00115] Em certas modalidades, uma Adnectina antimiostatina aqui descrito pode compreender a sequência tal como estabelecido na SEQ ID NO: 5 ou 6, em que pelo menos um das alças BC, DE e FG tal como representado por (Z)x, (Z)y, e (Z)z, respectivamente, são alterados. Como descrito acima, os resíduos de aminoácidos correspondendo aos resíduos 21-30, 51-56, e 76-87 da SEQ ID NO: 4 definem as alças BC, DE e FG ciclos, respectivamente. No entanto, deve ser entendido que nem todos os resíduos na região da alça precisa de ser modificada a fim de atingir um ligante <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que possui para forte afinidade com um alvo desejado (por exemplo, a miostatina).

[00116] Por exemplo, os resíduos 21 (S) e 22 (W) da alça BC, como mostrado na SEQ ID NO: 1 não precisam de ser modificados para se ligarem a miostatina. Isto é, domínios <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 com ligação de alta afinidade à miostatina podem ser obtidos modificando somente os resíduos 23-30 da alça BC, como mostrado na SEQ ID NO: 4. Isto é demonstrado nas alças BC exemplares na Tabela 1, o que indica que apenas as posições sublinhadas são modificadas.

[00117] Do mesmo modo, as posições 51 (P) e 56 (T) da alça DE, como mostrado na SEQ ID NO: 4 não precisam ser modificadas para ligação a miostatina. Isto é, domínios <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 com ligação de alta afinidade para a miostatina podem ser obtidos modificando somente os resíduos 52-55 da alça DE, como mostrado na SEQ ID NO: 4. Isto é

demonstrado nas alças DE exemplificadas na Tabela 1, o que indica que apenas resíduos abrangendo as posições sublinhadas foram alteradas.

[00118] Do mesmo modo, as posições 76 (T) e 87 (P) da alça FG como mostrado na SEQ ID NO: 1 não precisam ser modificadas para ligação a miostatina. Isto é, domínios <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 com ligação de alta afinidade à miostatina podem ser obtidos modificando somente os resíduos 77-86 da alça FG como mostrado na SEQ ID NO: 4. Isto é demonstrado nas alças FG exemplificados na Tabela 1, o que indica que apenas os resíduos que abrangem as posições sublinhadas foram alterados.

[00119] Por conseguinte, em algumas modalidades, as regiões de alça BC, DE e FG das Adnectinas antimioestatina da invenção podem ser descritas de acordo com as sequências de consenso. Estas sequências de consenso são exemplificadas pelas alças BC, DE e FG mostrados na Tabela 1, e tal como determinado por análise de WebLogo (Figuras 2-7.) Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A Sequência logo generator. *Genome Research* 2004;14:1188-1190, aqui incorporada por referência na sua totalidade). Análise de WebLogo gera um assinatura de aminoácido que reflete a frequência de aminoácidos em cada posição alterada da alça BC, DE, ou FG.

[00120] Por exemplo, em algumas modalidades, a alça BC, (Z)<sub>x</sub>, é definida pela sequência de consenso X<sub>1</sub>-L-P-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>, em que, X<sub>1</sub> é S, T ou Y; X<sub>2</sub> é H, Y, N, R, F, G, S ou T; X<sub>3</sub> é A, P, Q, S, F, H, N ou R; X<sub>4</sub> é G ou A; X<sub>5</sub> H, L, R, V, N, D, F, I ou K; X<sub>6</sub> é A, L, G, M, F, I ou V; e X<sub>7</sub> é H ou N. Em certas modalidades, a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 7, 11-21, 23-31, 34, e 36-38. Em uma modalidade, a alça BC compreende o aminoácido estabelecido em SEQ ID NO. 34.

[00121] Em algumas modalidades, a alça DE, (Z)<sub>y</sub>, é definida pela

sequência de consenso G-R-G- $X_8$ , em que  $X_8$  é V ou L. Em certas modalidades, a alça DE compreende um aminoácido selecionado a partir de SEQ ID NOs: 39 e 42. Em uma modalidade, a alça DE compreende o aminoácido estabelecido em SEQ ID NO. 39.

[00122] Em algumas modalidades, a alça FG,  $(Z)_z$ , é definida pela sequência de consenso  $X_9$ - $X_{10}$ - $X_{11}$ - $X_{12}$ - $X_{13}$ - $X_{14}$ - $X_{15}$ - $X_{16}$ - $X_{17}$ - $X_{18}$ , em que  $X_9$  é L, V ou I;  $X_{10}$  é T ou S;  $X_{11}$  é K, R, A, G, S, D, H, N, T ou P;  $X_{12}$  é S, T, A, E, H, K ou N;  $X_{13}$  é K, G, Q, D, E, N, T ou S;  $X_{14}$  é V, I, F, L, M, P, T ou Y;  $X_{15}$  é I, L ou Y;  $X_{16}$  é H, I, V, K, L, R, F, G, S ou T;  $X_{17}$  é Y ou H; e  $X_{18}$  é K, M, L, R ou V. Em certas modalidades, a alça FG compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 46, 50-62, 64-72, 75-77, e 79. Em uma modalidade, a alça FG compreende o aminoácido estabelecido em SEQ ID NO. 75.

[00123] Em outras modalidades, a alça BC,  $(Z)_x$ , é definida pela sequência de consenso  $X_{19}$ - $X_{20}$ -P- $X_{21}$ -G- $X_{22}$ -A, em que  $X_{19}$  é D, E, V ou W;  $X_{20}$  é A, S ou V;  $X_{21}$  é R, A, G, K ou L; e  $X_{22}$  é L ou R. Em certas modalidades, a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 8-10, 22, 32, 33, e 35.

[00124] Em outras modalidades, a alça DE,  $(Z)_y$ , é definida pela sequência de consenso  $X_{23}$ -G-R-G- $X_{24}$ , em que  $X_{23}$  é V, P, F, I ou L; e  $X_{24}$  é S, N ou T. Em certas modalidades, a alça DE compreende e sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 40, 41, e 43-45.

[00125] Em outras modalidades, a alça FG,  $(Z)_z$ , é definida pela sequência de consenso  $X_{25}$ - $X_{26}$ -R- $X_{27}$ -G- $X_{28}$ - $X_{29}$ - $X_{30}$ - $X_{31}$ - $X_{32}$ , em que  $X_{25}$  é I ou V;  $X_{26}$  é F, D ou Y;  $X_{27}$  é D ou T;  $X_{28}$  é P, M, V ou T;  $X_{29}$  é V, L, N, R ou S;  $X_{30}$  é H, T, L, N, Q ou S;  $X_{31}$  é F, W, Y, H ou L; e  $X_{32}$  é D, A ou G. Em certas modalidades a alça FG compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 47-49, 63, 73, 74, e 78.

[00126] Conseqüentemente, em certas modalidades a invenção provê uma Adnectina antimioestatina compreendendo uma alça BC,  $(Z)_x$ , tendo a seqüência  $X_1-L-P-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$  e uma alça DE,  $(Z)_y$ , tendo a seqüência  $G-R-G-X_8$ , como definida acima. Em certas modalidades, a alça BC compreende uma seqüência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 7, 11-21, 23-31, 34, e 36-38, e a alça DE compreende uma seqüência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 39 e 42. Em uma modalidade, as alças BC e DE compreendem as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NOs: 34 e 39, respectivamente.

[00127] Em certas modalidades, a Adnectina antimioestatina compreende uma alça C,  $(Z)_x$ , tendo a seqüência  $X_1-L-P-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$  e uma alça FG,  $(Z)_z$ , tendo a seqüência  $X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$ , como definida acima. Em certas modalidades, a alça BC compreende uma seqüência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 7, 11-21, 23-31, 34, e 36-38, e a alça FG compreende uma seqüência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 46, 50-62, 64-72, 75-77, e 79. Em uma modalidade, as alças BC e FG compreendem as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NOs: 34 e 75, respectivamente.

[00128] Em certas modalidades a Adnectina antimioestatina compreende uma alça DE,  $(Z)_y$ , tendo a seqüência  $G-R-G-X_8$  e uma alça FG,  $(Z)_z$ , tendo a seqüência  $X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$ , como definida acima. Em certas modalidades, a alça DE compreende uma seqüência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 39 e 42, e a alça FG compreende uma seqüência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 46, 50-62, 64-72, 75-77, e 79. Em uma modalidade, as alças DE e FG compreendem as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NOs: 39 e 75, respectivamente.

[00129] Em certas modalidades, a Adnectina antimioestatina

compreende uma alça BC,  $(Z)_x$ , tendo a sequência  $X_1-L-P-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ , uma alça DE,  $(Z)_y$ , tendo a sequência  $G-R-G-X_8$  e uma alça FG,  $(Z)_z$ , tendo a sequência  $X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$ , como definida acima. Em certas modalidades, a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 7, 11-21, 23-31, 34, e 36-38, a alça DE compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 39 e 42, e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 46, 50-62, 64-72, 75-77, e 79. Em uma modalidade, as alças BC, DE, e FG compreendem as sequências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente.

[00130] Em outras modalidades, a invenção provê uma Adnectina antimioestatina compreendendo uma alça BC,  $(Z)_x$ , tendo a sequência  $X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A$  e uma alça DE,  $(Z)_y$ , tendo a sequência  $X_{23}-G-R-G-X_{24}$ , como definida acima. Em certas modalidades, a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 8-10, 22, 32, 33, e 35 e a alça DE compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 40, 41, e 43-45.

[00131] Em outras modalidades, a Adnectina antimioestatina compreende uma alça BC,  $(Z)_x$ , tendo a sequência  $X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A$  e uma alça FG,  $(Z)_z$ , tendo a sequência  $X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{30}-X_{32}$ , como definida acima. Em certas modalidades, a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 8-10, 22, 32, 33, e 35 e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 47-49, 63, 73, 74, e 78.

[00132] Em outras modalidades, a Adnectina antimioestatina compreende uma alça DE,  $(Z)_y$ , tendo a sequência  $X_{23}-G-R-G-X_{24}$  e uma alça FG,  $(Z)_z$ , tendo a sequência  $X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{30}-X_{32}$ , como definida acima. Em certas modalidades, a alça DE compreende

uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 40, 41, e 43-45 e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 47-49, 63, 73, 74, e 78.

[00133] Em outras modalidades, a Adnectina antimioestatina compreende uma alça BC,  $(Z)_x$ , tendo a sequência  $X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A$ , compreende uma alça DE,  $(Z)_y$ , tendo a sequência  $X_{23}-G-R-G-X_{24}$  e uma alça FG,  $(Z)_z$ , tendo a sequência  $X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{30}-X_{32}$ , como definida acima. Em certas modalidades, a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 8-10, 22, 32, 33, e 35, a alça DE compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 40, 41, e 43-45, e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 47-49, 63, 73, 74, e 78.

[00134] Em certas modalidades, uma Adnectina antimioestatina da invenção compreende a sequência estabelecida em SEQ ID NO: 5 ou 6, em que Alças BC, DE e FG como representados por  $(Z)_x$ ,  $(Z)_y$ , e  $(Z)_z$ , respectivamente, são substituídos por um respectivo conjunto de Alças BC, DE, e FG tendo a sequência de consenso de SEQ ID NOs: 7-38, 39-45, e 46-79, respectivamente.

[00135] Em outras modalidades preferidas, uma Adnectina antimioestatina da invenção compreende a sequência estabelecida em SEQ ID NO: 5 ou 6, em que Alças BC, DE e FG como representados por  $(Z)_x$ ,  $(Z)_y$ , e  $(Z)_z$ , respectivamente, são substituídos por um respectivo conjunto de Alças BC, DE, e FG tendo sequências pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, ou 99% idênticas às sequências de alça BC, DE ou FG dos clones listados na Tabela 1.

[00136] Em modalidades exemplares, uma Adnectina antimioestatina, como aqui descrita é definida pela SEQ ID NO: 5 e tem um respectivo conjunto de sequências de alça BC, DE e FG a partir de qualquer dos clones listados na Tabela 1. Por exemplo, o clone 1979\_B06 na Tabela

1 compreende Alça BC, DE e FG tal como estabelecido em SEQ ID NOs: 7, 39, e 46, respectivamente. Portanto, uma Adnectina antimiostatina com base nestas alças pode compreender SEQ ID NO: 5 ou 6, em que (Z)<sub>x</sub> compreende a SEQ ID NO: 7, (Z)<sub>y</sub> compreende a SEQ ID NO: 39, e (Z)<sub>z</sub> compreende SEQ ID NO: 46. Construtos semelhantes são contemplados utilizando o conjunto de alças BC, DE e FG a partir dos laços de outros clones da Tabela 1 ou as sequências de consenso de SEQ ID NOs: 7-38, 39-45, e 46-79, respectivamente. As regiões de arcabouço de tais Adnectinas antimiostatina podem compreender entre 0 a 20, de 0 a 15, de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, ou de 0 a 1, substituições, substituições conservadoras, deleções ou adições em relação aos resíduos de aminoácidos de arcabouço de SEQ ID NO: 4. Tais modificações de arcabouço podem ser feitas, tanto tempo quanto a Adnectina antimiostatina é capaz de ligar miostatina com um K<sub>D</sub> desejado.

[00137] Em modalidades preferidas, a alça BC da Adnectina antimiostatina da invenção compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em:

[00138] SWSLPHAGHVN (SEQ ID NO: 7), SWVSPRGRAR (SEQ ID NO: 8), SWEVPRGLAR (SEQ ID NO: 9), SWWAPLGLAR (SEQ ID NO: 10), SWTLPHAGLAH (SEQ ID NO: 11), SWYLPYPAHMN (SEQ ID NO: 12), SWSLPPFAGHLN (SEQ ID NO: 13), SWSLPYSGLAN (SEQ ID NO: 14), SWSLPHAGHAH (SEQ ID NO: 15), SWTLPNFGLIN (SEQ ID NO: 16), SWTLPHAGRAH (SEQ ID NO: 17), SWSLPYAGHLN (SEQ ID NO: 18), SWSLPYAAHMN (SEQ ID NO: 19), SWSLPYPGHLN (SEQ ID NO: 20), SWSLPYAGHAH (SEQ ID NO: 21), SWDAPGGLAR (SEQ ID NO: 22), SWSLPTPGLAH (SEQ ID NO: 23), SWSLPHRGVAN (SEQ ID NO: 24), SWSLPSSGVAH (SEQ ID NO: 25), SWSLPHHGFGH (SEQ ID NO: 26), SWSLPHAGDAH (SEQ ID NO: 27), SWSLPHNGVAH (SEQ ID NO: 28), SWSLPRQGLAN (SEQ ID NO: 29), SWSLPGPGHFH (SEQ ID NO:

30), SWSLPHPGLGH (SEQ ID NO: 31), SWDAPRGLAR (SEQ ID NO: 32), SWDAPAGLAR (SEQ ID NO: 33), SWSLPHQGKAN (SEQ ID NO: 34), SWDAPKGLAR (SEQ ID NO: 35), SWSLPNPGIAH (SEQ ID NO: 36), SWSLPRPGNAH (SEQ ID NO: 37), e SWSLPNPGNAH (SEQ ID NO: 38).

[00139] Em algumas modalidades, a alça BC de Adnectina o antimiostatina da invenção compreende a parte sublinhada de qualquer uma das SEQ ID NOs: 7-38, como mostrado na Tabela 1. Em uma modalidade, a alça BC compreende a porção sublinhada SEQ ID NO: 34.

[00140] Em algumas modalidades, a alça DE da Adnectina antimiostatina da invenção compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em: PGRGVT (SEQ ID NO: 39), PGRGST (SEQ ID NO: 40), LGRGST (SEQ ID NO: 41), PGRGLT (SEQ ID NO: 42), IGRGST (SEQ ID NO: 43), FGRGTT (SEQ ID NO: 44), e VGRGNT (SEQ ID NO: 45). Em algumas modalidades, a alça DE da Adnectina antimiostatina da invenção compreende a parte sublinhada de qualquer uma das SEQ ID NOs: 39-45, conforme mostrado na Tabela 1. Em uma modalidade, a alça DE compreende a porção sublinhada de SEQ ID NO: 39.

[00141] Em algumas modalidades, a alça FG da Adnectina antimiostatina da invenção compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em: TLTKSQMIHYMP (SEQ ID NO: 46), TIYRDGMSHHDP (SEQ ID NO: 47), TVYRDGPLLLAP (SEQ ID NO: 48), TIFRTGMVQYDP (SEQ ID NO: 49), TLTNSEIILYKP (SEQ ID NO: 50), TLTKSQILHHRP (SEQ ID NO: 51), TLTRSKIIHYMP (SEQ ID NO: 52), TLTHSNIIRYVP (SEQ ID NO: 53), TVSSTKVIVYLP (SEQ ID NO: 54), TITKSTIIYKP (SEQ ID NO: 55), TVTTTIVILYKP (SEQ ID NO : 56), TLTKS QLIH YMP (SEQ ID NO: 57), TLTRSQVIHYMP (SEQ ID NO: 58), TLTRSKIIHYMP (SEQ ID NO: 59), TVSSTK

VIHYKP (SEQ ID NO: 60), TLTKS KVIH PAC (SEQ ID NO: 61), TVTTTKVIHYKP (SEQ ID NO: 62), TIDRDGVNHFAP (SEQ ID NO: 63), TVTHHGVIGYKP (SEQ ID NO: 64), TLTGANVIIYKP (SEQ ID NO: 35), TVTNTGVIIYKP (SEQ ID NO: 66), TVTATGIIYKP (SEQ ID NO: 67), TVTRAGFYRYKP (SEQ ID NO: 68), TVTREEVISYKP (SEQ ID NO: 69), TVTAAGVIIYKP (SEQ ID NO: 70), TVTANQPIIYKP (SEQ ID NO: 71), TITPETIIVYKP (SEQ ID NO: 72), TIDRDGTRSFDP (SEQ ID NO: 73), TIFRDGPVTWDP (SEQ ID NO: 74), TVTDTGYLKYKP (SEQ ID NO : 75), TLTGSDTIFYKP (SEQ ID NO: 76), TVTGKDVIIYKP (SEQ ID NO: 77), TIFRDGVVNYGP (SEQ ID NO: 78), e TVTDTGF ITYKP (SEQ ID NO: 79).

[00142] Em algumas modalidades, a alça FG da Adnectina antimioestatina da invenção compreende a porção sublinhada de qualquer uma de SEQ ID NOs: 46-79, como mostrado na Tabela 1. Em uma modalidade, a alça FG compreende a porção sublinhada de SEQ ID NO: 75.

[00143] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende uma sequência de alça BC selecionada a partir das sequências de alça BC tendo SEQ ID NOs: 7-38, ou a porção sublinhada de qualquer uma de SEQ ID NOs: 7-38, como mostrado na Tabela 1; uma sequência de alça DE selecionada a partir das sequências de alça DE tendo SEQ ID NOs: 39-45, ou a porção sublinhada de qualquer uma de SEQ ID NOs: 39-45 como mostrado na Tabela 1; e uma sequência de alça FG selecionada a partir da sequência da alça FG tendo SEQ ID NOS: 46-79, ou a porção sublinhada de qualquer uma de SEQ ID NOS: 46-79 como mostrado na Tabela 1. Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende s sequência de aminoácido de alça BC, DE e FG pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% idênticas a qualquer uma de SEQ ID NOs: 7-38, 39-45, e 46-79, respectivamente.

Em outras modalidades, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende a sequência de aminoácido de alça BC, DE e FG pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% idênticas à porção sublinhada de qualquer uma de SEQ ID NOS: 7-38, 39-45, e 46-79, respectivamente, como mostrado na Tabela 1.

[00144] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 80-123, 228-239, e 252-273 (sequências de comprimento completo das tabelas 2, 5, e 6). Em uma modalidade, a Adnectina antimioestatina compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 273.

[00145] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina compreende uma sequência de aminoácido pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% idênticas a qualquer uma de SEQ ID NOS: 80-123, 228-239, e 252-273. Em outras modalidades, a Adnectina antimioestatina compreende uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% idênticas às regiões de alça sem BC, DE, e FG de SEQ ID NOs: 80-123, 228-239, e 252-273.

[00146] Em uma modalidade, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente. Em outra modalidade, a Adnectina antimioestatina compreende uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idênticas à sequência de aminoácido estabelecida em SEQ ID NO: 273 [PRD-1474], SEQ ID NO: 118 [3116\_A06], SEQ ID NO: 281 [sequência de Adnectina núcleo compartilhada por PRD-1474 e 3116\_A06, precedida por uma sequência de extensão N-terminal (GVSDVPRDL) e seguida por uma cauda C-terminal (EI)] ou SEQ ID NO: 331 [sequência de Adnectina núcleo de PRD-1474 e 3116\_A06 sem uma sequência líder

N-terminal ou cauda C-terminal]. A sequência de Adnectina núcleo de PRD-1474 e 3116\_A06 é estabelecida abaixo:

[00147] EVVAATPTSLISWVSLPHQGKANYRITYGETGGNSPVQE  
FTVPGRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVTDTGYLKYKPISINYRT  
(SEQ ID NO: 331)

[00148] Em ainda outra modalidade, a Adnectina antimioestatina da presente invenção compreende uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% idênticas às regiões de alça sem BC, DE, e FG de SEQ ID NO: 118, 273, 281, ou 331.

[00149] Em uma modalidade, a Adnectina antimioestatina da invenção e disclosed herein can be described in relation to a Adnectina antimioestatina compreendendo alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75.

[00150] Consequentemente, em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça BC compreende 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições de aminoácido, tais como substituições de aminoácido conservadoras. Consequentemente, em algumas modalidades, a alça BC é definida pela sequência de consenso  $X_{33}$ -L-P- $X_{34}$ - $X_{35}$ - $X_{36}$ - $X_{37}$ - $X_{38}$ - $X_{39}$ , em que  $X_{33}$  é T ou Y;  $X_{34}$  é Y, N, R, F, G, S, ou T;  $X_{35}$  é A, P, S, F, H, N, ou R;  $X_{36}$  é A;  $X_{37}$  é H, L, R, V, N, D, F, ou I;  $X_{38}$  é L, G, M, F, I, ou V; e  $X_{39}$  é H.

[00151] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça DE compreende 1 substituição de aminoácido, tal como uma substituição de aminoácido conservadora. Consequentemente, em algumas modalidades, a alça DE é definida pela sequência de consenso G-R-G- $X_{40}$ , em que  $X_{40}$  é L.

[00152] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina da

invenção compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente em que a alça FG compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 substituições de aminoácido, tais como substituições de aminoácido conservadoras. Conseqüentemente, em algumas modalidades, a alça FG é definida pela sequência de consenso  $X_{41}-X_{42}-X_{43}-X_{44}-X_{45}-X_{46}-X_{47}-X_{48}-X_{49}-X_{50}$ , em que  $X_{41}$  é L ou I;  $X_{42}$  é S;  $X_{43}$  é K, R, A, G, S, H, N, T, ou P;  $X_{44}$  é S, A, E, H, K, ou N;  $X_{45}$  é K, Q, D, E, N, T, ou S;  $X_{46}$  é V, I, F, L, M, P, ou T;  $X_{47}$  é I ou Y;  $X_{48}$  é H, I, V, L, R, F, G, S, ou T;  $X_{49}$  é H; e  $X_{50}$  é M, L, R, ou V.

[00153] Em algumas modalidades, a Adnectina antimiostatina da invenção compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça BC tem 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições de aminoácido, tais como substituições de aminoácido conservadoras, e a alça DE tem 1 substituição de aminoácido, tal como uma substituição de aminoácido conservadora. Em algumas modalidades, a alça BC tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{33}-L-P-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}$ , em que  $X_{33}$  é T ou Y;  $X_{34}$  é Y, N, R, F, G, S, ou T;  $X_{35}$  é A, P, S, F, H, N, ou R;  $X_{36}$  é A;  $X_{37}$  é H, L, R, V, N, D, F, ou I;  $X_{38}$  é L, G, M, F, I, ou V; e  $X_{39}$  é H, e a alça DE tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $G-R-G-X_{40}$ , em que  $X_{40}$  é L.

[00154] Em algumas modalidades, a Adnectina antimiostatina da invenção compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça BC tem 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições de aminoácido, tais como substituições de aminoácido conservadoras, e a alça FG tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 substituições de aminoácido, tais como substituições de aminoácido conservadoras. Em algumas modalidades, a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{33}-L-P-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}$ , em que  $X_{33}$  é T ou Y;  $X_{34}$  é Y, N, R, F, G, S, ou T;  $X_{35}$  é A, P,

S, F, H, N, ou R; X<sub>36</sub> é A; X<sub>37</sub> é H, L, R, V, N, D, F, ou I; X<sub>38</sub> é L, G, M, F, I, ou V; e X<sub>39</sub> é H, e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>41</sub>-X<sub>42</sub>-X<sub>43</sub>-X<sub>44</sub>-X<sub>45</sub>-X<sub>46</sub>-X<sub>47</sub>-X<sub>48</sub>-X<sub>49</sub>-X<sub>50</sub>, em que X<sub>41</sub> é L ou I; X<sub>42</sub> é S; X<sub>43</sub> é K, R, A, G, S, H, N, T, ou P; X<sub>44</sub> é S, A, E, H, K, ou N; X<sub>45</sub> é K, Q, D, E, N, T, ou S; X<sub>46</sub> é V, I, F, L, M, P, ou T; X<sub>47</sub> é I ou Y; X<sub>48</sub> é H, I, V, L, R, F, G, S, ou T; X<sub>49</sub> é H; e X<sub>50</sub> é M, L, R, ou V.

[00155] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que e a alça DE tem 1 substituição de aminoácido, tal como uma substituição de aminoácido conservadora, e a alça FG tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 substituições de aminoácido, tais como substituições de aminoácido conservadoras. Em algumas modalidades, a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G-X<sub>40</sub>, em que X<sub>40</sub> é L, e a alça FG tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>41</sub>-X<sub>42</sub>-X<sub>43</sub>-X<sub>44</sub>-X<sub>45</sub>-X<sub>46</sub>-X<sub>47</sub>-X<sub>48</sub>-X<sub>49</sub>-X<sub>50</sub>, em que X<sub>41</sub> é L ou I; X<sub>42</sub> é S; X<sub>43</sub> é K, R, A, G, S, H, N, T, ou P; X<sub>44</sub> é S, A, E, H, K, ou N; X<sub>45</sub> é K, Q, D, E, N, T, ou S; X<sub>46</sub> é V, I, F, L, M, P, ou T; X<sub>47</sub> é I ou Y; X<sub>48</sub> é H, I, V, L, R, F, G, S, ou T; X<sub>49</sub> é H; e X<sub>50</sub> é M, L, R, ou V.

[00156] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, em que a alça BC tem 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições de aminoácido, tais como substituições de aminoácido conservadoras, e a alça DE tem 1 substituição de aminoácido, tal como uma substituição de aminoácido conservadora, e a alça FG tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 substituições de aminoácido, tais como substituições de aminoácido conservadoras. Em algumas modalidades, a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>33</sub>-L-P-X<sub>34</sub>-X<sub>35</sub>-X<sub>36</sub>-X<sub>37</sub>-X<sub>38</sub>-X<sub>39</sub>, em que X<sub>33</sub> é T

ou Y; X<sub>34</sub> é Y, N, R, F, G, S, ou T; X<sub>35</sub> é A, P, S, F, H, N, ou R; X<sub>36</sub> é A; X<sub>37</sub> é H, L, R, V, N, D, F, ou I; X<sub>38</sub> é L, G, M, F, I, ou V; e X<sub>39</sub> é H; a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G-X<sub>40</sub>, em que X<sub>40</sub> é L; e a alça FG tem uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>41</sub>-X<sub>42</sub>-X<sub>43</sub>-X<sub>44</sub>-X<sub>45</sub>-X<sub>46</sub>-X<sub>47</sub>-X<sub>48</sub>-X<sub>49</sub>-X<sub>50</sub>, em que X<sub>41</sub> é L ou I; X<sub>42</sub> é S; X<sub>43</sub> é K, R, A, G, S, H, N, T, ou P; X<sub>44</sub> é S, A, E, H, K, ou N; X<sub>45</sub> é K, Q, D, E, N, T, ou S; X<sub>46</sub> é V, I, F, L, M, P, ou T; X<sub>47</sub> é I ou Y; X<sub>48</sub> é H, I, V, L, R, F, G, S, ou T; X<sub>49</sub> é H; e X<sub>50</sub> é M, L, R, ou V.

[00157] Em uma modalidade, a Adnectina antimiostatina da invenção compreende as alças BC, DE, e FG como estabelecido em SEQ ID NOs: 34, 39, e 75, respectivamente, e tem substituições de aminoácido nas alças BC, DE, e FG que permite que a Adnectina antimiostatina mantenha ligação a miostatina. Tais substituições de aminoácido podem ser determinadas por, por exemplo, varredura mutacional profunda, como descrito no Exemplo 8.

[00158] Conseqüentemente, em algumas modalidades, a Adnectina antimiostatina da invenção compreende uma alça BC compreendendo uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>51</sub>-X<sub>52</sub>-X<sub>53</sub>-X<sub>54</sub>-X<sub>55</sub>-X<sub>56</sub>-X<sub>57</sub>-X<sub>58</sub>-X<sub>59</sub>, em que: X<sub>51</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>52</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em L, M, e V; X<sub>53</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, e Y; X<sub>54</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>55</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>56</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em G e S; X<sub>57</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>58</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, G, L, M, S, e T; e X<sub>59</sub> é selecionado a partir do

grupo consistindo em A, C, F, H, N, P, Q, R, S, e Y. Em uma modalidade preferida, X<sub>51</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, S, V, W, e Y; X<sub>52</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em L; X<sub>53</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em P; X<sub>54</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>55</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>56</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em G; X<sub>57</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, e Y; X<sub>58</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, L, M, e S; e X<sub>59</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em C, H, N, Q, S, e Y. Em uma modalidade mais preferida, X<sub>51</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em F, S, e W; X<sub>52</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em L; X<sub>53</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em P; X<sub>54</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>55</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, e Y; X<sub>56</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em G; X<sub>57</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, H, K, L, M, N, R, V, W, e Y; X<sub>58</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, e L; e X<sub>59</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em H, N, e Q.

[00159] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende uma alça DE compreendendo uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G-X<sub>60</sub>, em que X<sub>60</sub> é A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T, e V. Em uma modalidade preferida, X<sub>60</sub> é C, E, I, L, M, Q, T, e V. Em uma modalidade mais preferida, X<sub>60</sub> é C, E, I, L, M, e V.

[00160] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende uma alça FG compreendendo uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>61</sub>-X<sub>62</sub>-X<sub>63</sub>-X<sub>64</sub>-X<sub>65</sub>-X<sub>66</sub>-X<sub>67</sub>-X<sub>68</sub>-

$X_{69}$ - $X_{70}$ , em que  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W, e Y;  $X_{62}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W, e Y;  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, W, e Y; e  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y. Em uma modalidade preferida,  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, I, L, M, e V;  $X_{62}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, L, M, P, T, V, W, e Y;  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, e Y;  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, e V. Em uma modalidade mais preferida,  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em I e V;  $X_{62}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, L, M, T, V, W, e Y;  $X_{63}$  é

selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, e V; X<sub>64</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y; X<sub>65</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, S, T, e W; X<sub>66</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em F, I, V, W, e Y; X<sub>67</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em F, H, I, L, M, V, W, e Y; X<sub>68</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, G, I, K, L, M, T, V, e W; X<sub>69</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e X<sub>70</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, K, L, M, P, Q, e R.

[00161] Em algumas modalidades, a Adnectina antimiostatina da invenção compreende alças BC, DE, e FG, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>51</sub>-X<sub>52</sub>-X<sub>53</sub>-X<sub>54</sub>-X<sub>55</sub>-X<sub>56</sub>-X<sub>57</sub>-X<sub>58</sub>-X<sub>59</sub>, em que, X<sub>51</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>52</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em L, M, e V; X<sub>53</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, e Y; X<sub>54</sub> é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>55</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>56</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em G e S; X<sub>57</sub> é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>58</sub> é A, C, G, L, M, S, e T; e X<sub>59</sub> é A, C, F, H, N, P, Q, R, S, e Y; a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G-X<sub>60</sub>, em que X<sub>60</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T, e V; e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>61</sub>-X<sub>62</sub>-X<sub>63</sub>-X<sub>64</sub>-X<sub>65</sub>-X<sub>66</sub>-X<sub>67</sub>-X<sub>68</sub>-X<sub>69</sub>-X<sub>70</sub>, em que X<sub>61</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W, e Y; X<sub>62</sub> é A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>63</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y; X<sub>64</sub> é selecionado a partir do grupo

consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W, e Y;  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, W, e Y; e  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y.

[00162] Em uma modalidade preferida, a Adnectina antimioestatina da invenção compreende alças BC, DE, e FG, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ , em que,  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, S, V, W, e Y;  $X_{52}$  é L;  $X_{53}$  é P;  $X_{54}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{56}$  é G;  $X_{57}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, e Y;  $X_{58}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, L, M, e S; e  $X_{59}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, H, N, Q, S, e Y; a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G- $X_{60}$ , em que  $X_{60}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, E, I, L, M, Q, T, e V; e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ , em que  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, I, L, M, e V;  $X_{62}$  é C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;

$X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, L, M, P, T, V, W, e Y;  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, e Y;  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y.

[00163] Em uma modalidade mais preferida, a Adnectina antimiostatina da invenção compreende alças BC, DE, e FG, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ , em que,  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, S, e W;  $X_{52}$  é L;  $X_{53}$  é P;  $X_{54}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W, e Y;  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, e Y;  $X_{56}$  é G;  $X_{57}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, H, K, L, M, N, R, V, W, e Y;  $X_{58}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, e L; e  $X_{59}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em H, N, e Q; a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G- $X_{60}$ , em que  $X_{60}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, E, I, L, M, e V; e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ , em que  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em I e V;  $X_{62}$  é C, F, I, L, M, T, V, W, e Y;  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, e V;  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, S, T, e W;  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, I, V, W, e Y;  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, H, I, L,

M, V, W, e Y; X<sub>68</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, G, I, K, L, M, T, V, e W; X<sub>69</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e X<sub>70</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, K, L, M, P, Q, e R.

[00164] Em algumas modalidades, a Adnectina antimiostatina é codificada por uma sequência de ácido nucleico como estabelecido em qualquer uma de SEQ ID NOS: 124-167, 240-251, e 284-305 (sequências de comprimento completo das tabelas 2, 5, e 6). Em algumas modalidades, a Adnectina antimiostatina é codificada por uma sequência de ácido nucleico que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS: 124-167, 240-251, e 284-305.

[00165] Fibronectina naturalmente liga-se a certos tipos de integrinas através do seu motivo de ligação a integrina, "ácido aspártico-arginina-glicina" (RGD). Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende um domínio <sup>10</sup>Fn3 que falta o motivo de ligação de integrina (RGD). O domínio de ligação de integrina pode ser removido através da alteração da sequência RGD por substituição de aminoácidos, deleção ou inserção.

[00166] Em algumas modalidades, sequências de aminoácidos de alça BC, DE e/ou FG idêntica à parte sublinhada de qualquer uma das SEQ ID NOS: 7-38, 39-45, e 46-79, respectivamente, como mostrado na Tabela 1, são enxertadas em arcabouços de proteína de domínio não-<sup>10</sup>Fn3. Por exemplo, uma ou mais sequências de aminoácidos de alça é trocada por ou inserida em uma ou mais alças de CDR de um anticorpo de cadeia pesada ou leve ou um fragmento do mesmo. Em outras modalidades, o domínio de proteína em que uma ou mais sequências de alça de aminoácidos são trocadas ou inseridas inclui, mas não está limitado a, os domínios Fn3 de consenso (Centocor, US), proteínas de repetição de anquirina (Molecular Partners AG, Zurique,

Suíça), anticorpos de domínio (Domantis, Ltd, Cambridge, MA), nanocorpos de camelídeos de único domínio (Ablynx, Bélgica), Lipocalinas (por exemplo, anticalinas; Pieris Proteolab AG, Freising, Alemanha), Avímeros (Amgen, CA), afficorpos (Affibody AG, Suécia), ubiquitina (por exemplo, affilins; Scil Proteins GmbH, Halle, Alemanha), miméticos de epítipo de proteína (Polyphor Ltd, Allschwil, Suíça), arcabouços feixe helicoidal (por exemplo alphabodies, Complex, Bélgica), domínios SH3 Fyn (Covagen AG, Suíça), ou atrímeros (Anáfora, Inc., CA).

[00167] As SEQ ID NOs das alças de BC, DE e FG das Adnectinas antimioestatina exemplares da invenção são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1**

Alças BC, DE, e FG de Adecina antimioestatina						
Sequências de Alça						
Clone	Alça BC	SEQ ID NO:	Alça DE	SEQ ID NO:	Alça FG	SEQ ID NO:
1979_B06	<u>SWSLPHAGHVN</u>	7	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSQMIHYMP</u>	46
2062_G02	<u>SWVSPRGRAR</u>	8	<u>PGRGST</u>	40	<u>TIYRDGMSHHDP</u>	47
2522_C09	<u>SWEVPRGLAR</u>	9	<u>LGRGST</u>	41	<u>TVYRDGPLLLAP</u>	48
2523_G06	<u>SWWAPLGLAR</u>	10	<u>PGRGST</u>	40	<u>TIFRTGMVQYDP</u>	49
2524_C11	<u>SWTLPHAGLAH</u>	11	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTNSEIILYKP</u>	50
2524_D09	<u>SWYLPYPAHMN</u>	12	<u>PGRGLT</u>	42	<u>TLTKSQILHHRP</u>	51
2524_E10	<u>SWSLPFAGHLN</u>	13	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSKIIHYMP</u>	52
2524_H05	<u>SWSLPYSGLAN</u>	14	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTHSNIIRYVP</u>	53
2524_H11	<u>SWSLPHAGHAH</u>	15	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVSSTKVIVYLP</u>	54
2525_B01	<u>SWTLPNFGLIN</u>	16	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TITKSTIIYKP</u>	55
2525_D02	<u>SWTLPHAGRAH</u>	17	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTTTTSVILYKP</u>	56
2525_D05	<u>SWSLPYAGHLN</u>	18	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSQILHYMP</u>	57
2525_F07	<u>SWSLPYAAHMN</u>	19	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSQVIHYMP</u>	58
2987_A06	<u>SWSLPHAGHAH</u>	15	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKIIHYMP</u>	59
2987_B04	<u>SWSLPYPGHLN</u>	20	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKIIHYMP</u>	59
2987_B09	<u>SWTLPHAGRAH</u>	17	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSKIIHYMP</u>	52
2987_C02	<u>SWSLPYAGHAH</u>	21	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKIIHYMP</u>	59
2987_D05	<u>SWSLPHAGHAH</u>	15	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSKIIHYMP</u>	52
2987_E03	<u>SWSLPYPGHLN</u>	20	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSKIIHYMP</u>	52
2987_E08	<u>SWTLPHAGRAH</u>	17	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVSSTKVIHYKP</u>	60
2987_F01	<u>SWSLPYAGHAH</u>	21	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSKIIHYMP</u>	52
2987_F06	<u>SWSLPHAGHAH</u>	15	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKVIHYMP</u>	61
2987_G04	<u>SWSLPYPGHLN</u>	20	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKVIHYMP</u>	61
2987_G09	<u>SWTLPHAGRAH</u>	17	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVSSTKVIVYLP</u>	54

2987_H02	<u>SWSLPYAGHAH</u>	21	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKVIHYMP</u>	61
2987_H07	<u>SWTLPHAGRAH</u>	17	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTTTKVIHYKP</u>	62
3006_A10	<u>SWDAPGGLAR</u>	22	<u>IGRGST</u>	43	<u>TIDRDGVNHFAP</u>	63
3007_B08	<u>SWSLPTPGLAH</u>	23	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTHHGVIYKP</u>	64
3007_C09	<u>SWSLPHRGVAN</u>	24	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTGANVVIYKP</u>	65
3007_C10	<u>SWSLPSSGVAH</u>	25	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTNTGVIIYKP</u>	66
3008_A03	<u>SWSLPHHGFGH</u>	26	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTATGIIYKP</u>	67
3008_B08	<u>SWSLPHAGDAH</u>	27	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTRAGFYRYKP</u>	68
3008_D04	<u>SWSLPHNGVAH</u>	28	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTREEVISYKP</u>	69
3008_F01	<u>SWSLPRQGLAN</u>	29	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTAAGVVIYKP</u>	70
3008_G01	<u>SWSLPGPGHFH</u>	30	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTANQPIIYKP</u>	71
3008_G03	<u>SWSLPHPGLGH</u>	31	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TITPETIIVYKP</u>	72
3115_D04	<u>SWDAPRGLAR</u>	32	<u>FGRGTT</u>	44	<u>TIDRDGTRSFDP</u>	73
3115_E06	<u>SWDAPAGLAR</u>	33	<u>VGRGNT</u>	45	<u>TIFRDGPVTWDP</u>	74
3116_A06	<u>SWSLPHQGKAN</u>	34	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTDTGYLKYKP</u>	75
3116_A07	<u>SWDAPKGLAR</u>	35	<u>VGRGNT</u>	45	<u>TIFRDGPVTWDP</u>	74
3116_C01	<u>SWSLPNPGIAH</u>	36	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTGSDTIFYKP</u>	76
3116_C06	<u>SWSLPRPGNAH</u>	37	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTGDVVIKYKP</u>	77
3116_H06	<u>SWDAPAGLAR</u>	33	<u>VGRGNT</u>	45	<u>TIFRDGVVNYGP</u>	78
3146_A08	<u>SWSLPNPGNAH</u>	38	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTDTGFITYKP</u>	79

[00168] As SEQ ID NOs de MonoAdnectinas antimioestatina exemplares da invenção são apresentadas na Tabela 2. **Tabela 2**

MonoAdnectinas antimioestatina		
	Sequência	
	Sequência de Aminoácido	Sequência de Ácido Nucleico
1979_B06 também referido aqui como ATI-1133  (Sequência de núcleo 1 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWVSLP HAGHVNYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTK SQMIHYMPISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO: 80)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTCTG CCGCATGCTGGTCATGTGAACATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACT GTGCCTGGTCGTGGTGTACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTCTGACTAAATCTCAGATGATCCATT ACATGCCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCAC CATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 124)
2062_G02 também referido aqui como ATI-1134  (Sequência de núcleo 2 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWVSP R GRARYRITYGETGGNSPVQEFTVPGR GSTATISGLKPGVDYITVYAVTIYRDG M SHHDPISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO: 81)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCC CACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGTT TCTCCGCGTGGTCGTGCTGATATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGA GGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCA CTGTGCCTGGTCGTGGTCTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG

AdCT1 (itálicos) com marcador His6)		TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTG TCACTATCTACCGTGACGGTATGTCT CATCATGACCCAATTTCCATTAATTAC CGCACAGAAATTGACAAACCATCCCA GCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 125)
2522_C09  (Sequência de núcleo 3 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEVP</u> RGLARYRITYGETGGNSPVQEFTVLG RGSTATISGLKPGVDYITVYAVTVYRD GPLLLAPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO: 82)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGTTGCTGCCACCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAAG TGCCGCGTGGCCTAGCTCGATATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGA GGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAC TGTGCTTGGTCGTGGTTCTACAGCTA C CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTC ACTGTGTACCGTGACGGGCGGTTGC TTCTTGCCCAATTTCCATTAATTACC GCACAGAAATTGACAAACCATCCAG CACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 126)
2523_G06  (Sequência de núcleo 4 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWWA</u> PLGLARYRITYGETGGNSPVQEFTV PGRGSTATISGLKPGVDYITVYAVTI FRTGMVQYDPISINYRTEIDKPSQHSH HHH (SEQ ID NO: 83)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGTTGCTGCCACCCC CACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTGG GCCCCGCTGGGTCTTGTCTGATATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGA GGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAC TGTGCCTGGTCGGGGCTCTACAGCTA CCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTC ACTATCTCCGTACGGGCATGGTTCA A TATGACCCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 127)
2524_C11  (Sequência de núcleo 5 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTLPH</u> AGLAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG R GVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTNSI ILYKPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO: 84)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGTTGCTGCCACCCC CACCAGCCTGCTGATCAGCTGGACT CTGCCGCATGCTGGTCTTGCGCACTA TTACCGCATCACTTACGGCGAAACAG GAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGCCTGGTCGTGGTTACAGC TACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTG TCACTCTGACTAATTCTGAGATTATCC TTTACAAGCCAATTTCCATTAATTACC G CACAGAAATTGACAAACCATCCAGC ACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO:

		128)
2524_D09  (Sequência de núcleo 6 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWYLPY PAHMNYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGLTATISGLKPGVDYITIVYAVTLTKSQ ILHHRPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 85)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCC CCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGT ACCTCCCGTATCCTGCGCATATGAAC TATTACCGCATCACTTACGGCGAAA CAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGA GTTCACTGTGCCTGGGCGGGGTCT GACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTG TGTATGCTGTCACTCTGACAAAATCT CAGATTCTCCATCATAGGCCAATTC CATTAAATACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCAGCACCATCACCAC CACCAC (SEQ ID NO: 129)
2524_E10  (Sequência de núcleo 7 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWVSLP FAGHLNYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVLTR S KIIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 86)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG GACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGT CATTGCCGTTTGTGGTCATTTGAAC TATTACCGCATCACTTACGGCGAAA CAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGA GTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTA CAGCTACCATCAGCGGCCTTAAAC CTGGCGTTGATTATACCATCACTGTG TATGCTGTCACTCTGACTCGCTCTAA GATTATTCATTATATGCCAATTTCCAT TAATTACCGCACAGAAATTGACAAAC CATCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 130)
2524_H05  (Sequência de núcleo 8 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWVSLPY SGLANYRITYGETGGNSPVQEFTVPG R GVTATISGLKPGVDYITIVYAVTLTHSNII RYVPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 87)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCC CACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCT CTGCCTTATTCTGGCCTTGCGAACTA TTACCGCATCACTTACGGCGAAACAG GAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGCCTGGTCGTGGGGTTACAG CTACTATCAGCGGCCTTAAACCTGG CGTTGATTATACCATCACTGTGTATG CTGTCACTCTGACTCACTAATATAA TTCGATACGTGCCAATTTCCATTAATT ACCGCACAGAAATTGACAAACCATCC CAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 131)

<p>2524_H11</p> <p>(Sequência de núcleo 9 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWLP HAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFTV PGRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVS STKVIVYLPISINYRTEIDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 88)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCCCTA CCGCATGCGGGTCATGCGCACTATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCCT GTGCCTGGTCGTGGAGTTACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTGTGTCTAGTACAAAGGTGATAGTTT ACCTGCCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCAC CATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 132)</p>
<p>2525_B01</p> <p>(Sequência de núcleo 10 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWLPN FGLINYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTITKS TIIYKIPISINYRTEIDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 89)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCC CCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGAC TTTGCCGAATTCGGTCTTATTAATTA TTACCGCATCACTTACGGCGAAACAG GAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTT CACTGTGCCTGGTCGTGGTGTACA GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTA TGCTGTCACTATCACCAAATCTACTA TCATCATTTACAAGCCAATTTCCATTA ATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA CCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 133)</p>
<p>2525_D02</p> <p>(Sequência de núcleo 11 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWLPN AGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTITTS VILYKIPISINYRTEIDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 90)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCC CCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGACT TTGCCGATGCTGGTCGTGCGCACTA TTACCGCATCACTTACGGCGAAACAG GAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTT CACTGTGCCTGGGCGGGGTGTACA GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTAT GCTGTCACTGTGACGACAACCTCGG TGATCCTTTACAAGCCAATTTCCATTA ATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 134)</p>
<p>2525_D05</p> <p>(Sequência de núcleo 12 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWLPY AGHLNYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTKS QLIHYMPISINYRTEIDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 91)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCC CCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGT CTCTTCCTTATGCTGGTCATCTAAC TATTACCGCATCACTTACGGCGAAA CAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGA G</p>

marcador His6)		TTCCTGTGCCTGGTCTGGTGTGAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATACCATCACTGTGTAT GCTGTCACTCTGACTAAGTCTCAGCT GATACATTACATGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 135)
2525_F07  (Sequência de núcleo 13 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWSPY AAHMNYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTRS QVIHYMPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO: 92)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCC CCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTC TCTGCCGTATGCTGCTCACATGAAC TATTACCGCATCACTTACGGCGAAA CAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGA GTTCACTGTGCCTGGTCTGGTGTTA CAGCTACCATCAGCGGCCTTAAAC CTGGCGTTGATTATACCATCACTGTG TATGCTGTCACTTTGACTAGATCACA GGTGATTCATTACATGCCAATTTCCAT TAATTACCGCACAGAAATTGACAAAC CATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 136)
2987_A06  (Sequência de núcleo 14 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWSP HAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTK SKIIHYMPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO: 93)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGA TCTGGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGA CCAGCCTGCTGATTAGCTGGTCACTG CCGCATGCAGGTCATGCACATTATTA TCGTATTACCTATGGTAAACCGGTG GTAATAGTCCGGTTCAGGAATTCACC GTTCCGGGTCTGGTGTACCAGCAAC CATTAGCGGTCTGAAACCGGTGTTG ATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTA CCC TGACAAAAGCAAATTTATTATTATA TGCCGATTAGCATTAAATATCGCACC GAAATTGATAAACCGAGCCAGCATC ATCATCACCATCAT (SEQ ID NO: 137)
2987_B04  (Sequência de núcleo 15 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWSPY PGHLNYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTKSK IIHYMPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO: 94)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGA ATCTGGAAGTGTGTCAGCAACCC CGACCAGCCTGCTGATTAGCTGGTC ACTGCCGTATCCGGTCTATCTGAATT ATTATCGTATTACCTATGGTAAACCG GTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAATTC ACCGTTCGGGTCTGGTGTACCAGC AACCATTAGCGGTCTGAAACCGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGC AGTTACCCTGACAAAAGCAAATTTAT TCATTATATGCCGATTAGCATTAAATTA T CGCACCGAAATTGATAAACCGAGCCA

		GCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO: 138)
2987_B09  (Sequência de núcleo 16 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWTLPH AGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTRS K IIHYMPISINYRTE <i>DKPSQH</i> HHHHH (SEQ ID NO: 95)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTG ATCTGGAAGTTGTTGCAGCAACCCC GACCAGCCTGCTGATTAGCTGGAC CCTGCCGCATGCAGGTCGTGCACAT TATTATCGTATTACCTATGGTGA AAC CGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCGGGTCTGGTGTAC CGCAACCATTAGCGGTCTGAAAC CGGGTGTGATTACACCATTACCGTT TATGCAGTACCCTGACCCGCAG CAAATTATTATTATATGCCGATTAG CATTAAATTATCGCACCGAAATTGA TAAACCGAGCCAGCATCATCAC CATCAT (SEQ ID NO: 139)
2987_C02  (Sequência de núcleo 17 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWSLPY AGHAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTKS KIIHYMPISINYRTE <i>DKPSQH</i> HHHHH (SEQ ID NO: 96)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGG TGATCTGGAAGTTGTTGCAGCAAC CCCGACCAGCCTGCTGATTAGCTGG TCACTGCCGTATGCAGGTCATGCACA TTATTATCGTATTACCTATGGTGA AAC CGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCGGGTCTGGTGTAC CGCAACCATTAGCGGTCTGAAAC CGGGTGTGATTACACCATTACCGTT TATGCAGTACCCTGACCAAAGCAA AATTATTATTATATGCCGATTAG CATTAAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCACACC ATCAT (SEQ ID NO: 140)
2987_D05  (Sequência de núcleo 18 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWSLP HAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFTV PGRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTL TRSKIIHYMPISINYRTE <i>DKPSQH</i> HHHHH H (SEQ ID NO: 97)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTG ATCTGGAAGTTGTTGCAGCAACCCC GACCAGCCTGCTGATTAGCTGGTAC TGCCGCATGCAGGTCATGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTGA AACCGG TGGAATAGTCCGGTTCAGGAATTCA CCGTTCCGGGTCTGGTGTACCGC AACCATTAGCGGTCTGAAACCGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCA GTTACCCTGACCCGCAGCAAAATTAT TCATTATATGCCGATTAGCATTAA TTCGCACCGAAATTGATAAACCGAGC CAGCATCATCATCAC CATCAT (SEQ ID NO: 141)

<p>2987_E03</p> <p>(Sequência de núcleo 19 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWVSLP YPGHLYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTR S KIIHYMPISINYRTE/IDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 98)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTG ATCTGGAAGTTGTTGCAGCAACCCC GACCAGCCTGCTGATTAGCTGGTCAC TGCCGTATCCGGGTCATCTGAATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCG GTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAATTC ACCGTCCGGGTCGTGGTGTACC GCAACCATTAGCGGTCTGAAACC GGGTGTTGATTACACCATTACCGTTTA TGCAGTACCCTGACCCGCAGC AAAATTATCATTATATGCCGATTAG CATTAAATATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCAC CATCAT (SEQ ID NO: 142)</p>
<p>2987_E08</p> <p>(Sequência de núcleo 20 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWVTLPH AGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVSST KVIHYKPISINYRTE/IDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 99)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTG ATCTGGAAGTTGTTGCAGCAACCC CGACCAGCCTGCTGATTAGCTGGACC CTGCCGCATGCAGGTCGTGCACATTA TTATCGTATTACCTATGGTGAAACC GGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAATT CACCGTCCGGGTCGTGGTGTACC CAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGG TGTTGATTACACCATTACCGTTTATGC AGTTACCGTTAGCAGCACCAAAGTG ATTCATTATAAACCGATTAGCATTAA TATCGCACCGAAATTGATAAACCGAG CCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO: 143)</p>
<p>2987_F01</p> <p>(Sequência de núcleo 21 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWVSLPY AGHAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTRS KIIHYMPISINYRTE/IDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 100)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGA TCTGGAAGTTGTTGCAGCAACCCCG ACCAGCCTGCTGATTAGCTGGTCACT GCCGTATGCAGGTCATGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGG TGGAATAGTCCGGTTCAGGAATTCA CCGTTCCGGGTCGTGGTGTACC ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTG TTGATTACACCATTACCGTTTATGCAG TTACCCTGACCCGCAGCAAAATTATT CATTATATGCCGATTAGCATTAA TCGCACCGAAATTGATAAACCGAG CCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO: 144)</p>
<p>2987_F06</p> <p>(Sequência de núcleo 22 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWVSLP HAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTK SKVIHYMPISINYRTE/IDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 101)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGG TGATCTGGAAGTTGTTGCAGCAAC CCCGACCAGCCTGCTGATTAGCTGG TCACTGCCGCATGCAGGTCATGCACA TTATTATCGTATTACCTATGGTGAAAC CGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTCCGGGTCGTGGTGTACC</p>

marcador His6)		CGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCG GGTGTGATTACACCATTACCGTTTA TGCAGTTACCCTGACCAAAGCAAAG TGATTCATTATATGCCGATTAGCATT ATTATCGCACCGAAATTGATAACCG AGCCAGCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO: 145)
2987_G04  (Sequência de núcleo 23 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWLPY PGHLNYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTKSK VIHYMPISINYRTEIDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 102)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTG ATCTGGAAGTTGTTGCAGCAACCCC GACCAGCCTGCTGATTAGCTGGTCAC TGCCGTATCCGGGTCTGTAATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGG TGGAATAGTCCGGTTCAGGAATTCA CCGTTCCGGGTCTGGTGTACCGC AACCATTAGCGGTCTGAAACCGGG TGTTGATTACACCATTACCGTTTATG CAGTTACCCTGACCAAAGCAAAG TGATTCATTATATGCCGATTAGCATT ATTATCGCACCGAAATTGATAAACCC GAGCCAGCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO: 146)
2987_G09  (Sequência de núcleo 24 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWTLPH AGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVSST K VIVYLPISINYRTEIDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 103)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGA TCTGGAAGTTGTTGCAGCAACCCC GACCAGCCTGCTGATTAGCTGGACC CTGCCGCATGCAGGTCGTGCACATTA TTATCGTATTACCTATGGTGAAACCG GTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAATTC ACCGTTCCGGGTCTGGTGTACCG CAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGG TGTTGATTACACCATTACCGTTTATG CAGTTACCGTTAGCAGCACCAAAGT TATTGTTTATCTGCCGATTAGCATTAA TTATCGCACCGAAATTGATAAACCGA GCCAGCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO: 147)
2987_H02  (Sequência de núcleo 25 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWLPY AGHAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTLTKSK VIHYMPISINYRTEIDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 104)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGA TCTGGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGA CCAGCCTGCTGATTAGCTGGTCACTG CCGTATGCAGGTCATGCACATTATTAT CGTATTACCTATGGTGAAACCGGTGG TAATAGTCCGGTTCAGGAATTCACCG TTCCGGGTCTGGTGTACCGCAACC ATTAGCGGTCTGAAACCGGTGTTGA TTACACCATTACCGTTTATGCAGTTAC CCTGACCAAAGCAAAGTGATTCATT ATATGCCGATTAGCATTAAATTATCGCA CCGAAATTGATAAACCGAGCCAGCAT CATCATCACCATCAT (SEQ ID NO: 148)

<p>2987_H07</p> <p>(Sequência de núcleo 26 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWTLPH          AGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG          RGV TATISGLKPGVDYITVYAVTVTTK          VIHYPISINYRTEIDKPSQH HHHHH          (SEQ ID NO: 105)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGA          TCTGGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGA          CCAGCCTGCTGATTAGCTGGACCCTG          CCGCATGCAGGTCGTGCACATTATTA          TCGTATTACCTATGGTGAAACCGGTG          GTAATAGTCCGGTTCAGGAATTCACC          GTTCCGGGTCGTGGTGTACCGCAAC          CATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTG          ATTACACCATTACGTTTTATGCAGTTA          CCGTTACCACCACCAAAGTGATTCAT          TATAAACCGATTAGCATTAAATTATCGC          ACCGAAATTGATAAACCGAGCCAGCA          TCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO:          149)</p>
<p>3006_A10</p> <p>(Sequência de núcleo 27 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWDAP          GGLARYRITYGETGGNSPVQEFTVIG          RGSTATISGLKPGVDYITVYAVTIDRD          GVNHFAPISINYRTEIDKPSQH HHHHH          (SEQ ID NO: 106)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA          CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCGA          CCAGCCTGCTGATCAGCTGGGACGC          TCCGGGTGGTCTGGCTCGATATTACC          GCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG          CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTG          TGATCGGTGCTGGTAGCACAGCTACC          ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGA          TTATACCATCACTGTGTATGCTGTCAC          TATCGACCGTGACGGTGTCAACCACT          TCGCCCCAATTTCCATTAATTACCGCA          CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCAC          CATCACCACCACCAC (SEQ ID NO:          150)</p>
<p>3007_B08</p> <p>(Sequência de núcleo 28 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWSLPT          PGLAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG          RGV TATISGLKPGVDYITVYAVTVTHH          GVIGYKPISINYRTEIDKPSQH HHHHH          (SEQ ID NO: 107)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA          CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCGA          CCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTCTG          CCGACTCCAGGTCTCGCCATTATTA          CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG          GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACT          GTGCCTGGTGGTGGTGTACAGCTAC          CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG          ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA          CTGTCACTCATCACGGCGTCATCGGC          TACAAACCAATTTCCATTAATTACCGC          ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA          CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO:          151)</p>
<p>3007_C09</p> <p>(Sequência de núcleo 29 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWSLP          HRGVANYRITYGETGGNSPVQEFTVP          GRGV TATISGLKPGVDYITVYAVTLTG          ANVIIYKPISINYRTEIDKPSQH HHHHH          (SEQ ID NO: 108)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA          CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCG          ACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTC          TGCCGCACCGTGGTGTCCCAATTAT          TACCGCATCACTTACGGCGAAACAG          GAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC          ACTGTGCCTGGTGGTGGTGTACA</p>

marcador His6)		GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTAT GCTGTCACTCTCACTGGAGCGAACGT CATCATCTACAAACCAATTTCCATTA ATTACCGCACAGAAATTGACAAACC ATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 152)
3007_C10  (Sequência de núcleo 30 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWSPS SGVAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVTNT GVIIYKPISINYRTEIDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 109)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCC CACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTC TCTGCCGAGCAGCGGTGTGCGCCAT TATTACCGCATCACTTACGGCGAAA CAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGA GTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTA CAGCTACCATCAGCGGCCTTAAAC CTGGCGTTGATTATACCATCACTGTG TATGCTGTCCTGCTACTAACACTGG TGTCATCATCTACAAACCAATTTCCAT TAATTACCGCACAGAAATTGACAAAC CATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 153)
3008_A03  (Sequência de núcleo 31 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWSP H HGFHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVTAT G IIIYKPISINYRTEIDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 110)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCC CACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTC TCTGCCGATCACGGTTTCGGCCAT TATTACCGCATCACTTACGGCGAAA CAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGA GTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTA CAGCTACCATCAGCGGCCTTAAAC CTGGCGTTGATTATACCATCACTGTG TATGCTGTCCTGCTACTGCTACGGG GATCATCATCTACAAACCAATTTCCAT TAATTACCGCACAGAAATTGACAAAC CATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 154)
3008_B08  (Sequência de núcleo 32 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWSP HAGDAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVTR AGFYRYKPISINYRTEIDKPSQHFFFFFFF (SEQ ID NO: 111)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTCTG CCGCACGCCGGTGACGCCATTATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACT GTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTGTTACTAGAGCGGGTTTCTACCGC TACAAACCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 155)

<p>3008_D04</p> <p>(Sequência de núcleo 33 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWVSLP HNGVAHYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTVTR EEVISYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 112)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTCTG CCGCATAATGGTGTGCGCCATTATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCCT GTGCCTGGTCTGTTACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTGTCACTCGGGAGGAAGTCATCAGC TACAAACCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 156)</p>
<p>3008_F01</p> <p>(Sequência de núcleo 34 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWVSLP RQGLANYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTVTA AGVIIYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 113)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTCTG CCGCGTCAGGGTCTCGCCAATTATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCCT GTGCCTGGTCTGTTACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTGTCACTGCTGCTGGGGTCATC TACAAACCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 157)</p>
<p>3008_G01</p> <p>(Sequência de núcleo 35 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWVSLP GPGHFHYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTVTA NQPIIYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 114)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTCTG CCGGGACCGGGTCACTTCCATTATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCCT GTGCCTGGTCTGTTACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTGTCACTGCTAACCAGCCCATC TACAAACCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 158)</p>
<p>3008_G03</p> <p>(Sequência de núcleo 36 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWVSLP HPGLGHYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTITPE TIIVYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 115)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTCTG CCGCACCCCGTCTCGGCCATTATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCCT GTGCCTGGTCTGTTACAGCTAC</p>

marcador His6)		CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCACTCCGAAACGATCATCGTC TACAAACCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 159)
3115_D04  (Sequência de núcleo 37 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWDAP RGLARYRITYGETGGNSPVQEFTVFG RGTTATISGLKPGVDYITVYAVTIDRDG TRSFDPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 116)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGGACGC TCCGAGAGGTCTGGCTCGATATTACC GCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTG TGTTCCGGTCTGGTACCACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGA TTATACCATCACTGTGTATGCTGTCAC TATCGACCGTGACGGTACCCGCAGCT TCGACCCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCAC CATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 160)
3115_E06  (Sequência de núcleo 38 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWDAP AGLARYRITYGETGGNSPVQEFTVVG RGNTATISGLKPGVDYITVYAVTIFRDG PVTWDPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 117)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGGACGC TCCGGCTGGTCTGGCTCGATATTACC GCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTG TGGTCCGGTCTGGTAAACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGA TTATACCATCACTGTGTATGCTGTCAC TATCTTCCGTGACGGTCCCGTCACCT GGGACCCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 161)
3116_A06  (Sequência de núcleo 39 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLISWVSLP HQGKANYRITYGETGGNSPVQEFTVVP GRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVTD TGYLKYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 118)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTCTG CCGCACCAAGGTAAGCCAATTATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACT GTGCCTGGTCTGGTGTACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTGTTACTGATACAGGGTACCTCAAG TACAAACCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 162)

<p>3116_A07</p> <p>(Sequência de núcleo 40 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWDAP KGLARYRITYGETGGNSPVQEFTVVG RGNTATISGLKPGVDYITIVYAVTIFRDG PVTWDPISINYRTE<i>DKPSQH</i>HHHHH (SEQ ID NO: 119)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGGACGC TCCGAAGGTCTGGCTCGATATTACC GCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTG TGGTCGGTCGTGGTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGA TTATACCATCACTGTGTATGCTGTAC TATCTCCGTGACGGTCCCGTACCT GGGACCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 163)</p>
<p>3116_C01</p> <p>(Sequência de núcleo 41 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWSLP NPGIAHYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTLTG SDTIFYKPISINYRTE<i>DKPSQH</i>HHHHH (SEQ ID NO: 120)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCA CCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTCTG CCGAATCCCGGTATCGCCATTATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACT GTGCCTGGTCGTGGTGTACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTCTCACTGGCAGTGACACCATCTTC TACAAACCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 164)</p>
<p>3116_C06</p> <p>(Sequência de núcleo 42 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWSLP RPGNAHYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVVTG KDVIKYPISINYRTE<i>DKPSQH</i>HHHHH (SEQ ID NO: 121)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCA ACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTCT GCCGCGGCCGGTAAACGCCATTAT T ACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCA CTGTGCCTGGTCGTGGTGTACAGCT A CCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTG TCACTGTTACTGGCAAAGATGTCATC AAGTACAACCAATTTCCATTAATTAC CGCACAGAAATTGACAAACCATCCCA GCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 165)</p>
<p>3116_H06</p> <p>(Sequência de núcleo 43 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com</p>	<p><u>MGVSDVPRDLE</u>VVAATPTSLISWDAP AGLARYRITYGETGGNSPVQEFTVV GRGNTATISGLKPGVDYITIVYAVTIFR DGVVNYGPISINYRTE<i>DKPSQH</i>HHHHH (SEQ ID NO: 122)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGA CCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCA CACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAC GCTCCGGCTGGTCTGGCTCGATATTA CCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTT CACTGTGGTCGGTCGTGGTAACACA</p>

marcador His6)		GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTAT GCTGTCACTATCTTCCGTGACGGTG TCGTCAACTACGGCCAATTTCCATTA ATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 166)
3146_A08  (Sequência de núcleo 44 de Adnectina tendo Sequência terminal AdNT1 (sublinhado) e AdCT1 (itálicos) com marcador His6)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSLP</u> NPGNAHYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVTD TGFITYKPISINYRTE/DKPSQHSHHHH (SEQ ID NO: 123)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGTTGCTGCCACCCC CACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCT CTGCCGAATCCGGGTAACGCCCATTA TTACCGCATCACTTACGGCGAAACAG GAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTT CACTGTGCCTGGTCTGGTGTACA GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATG CTGTCACTGTTACTGACACAGGTTTC A TCACGTACAAACCAATTTCCATTAATT ACCGCACAGAAATTGACAAACCATC CCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 167)

***Adnectinas de Competição Cruzada e/ou Adnectinas que se Ligam ao Mesmo Sítio de Ligação da Adnectina***

[00169] Em uma modalidade, Adnectinas da invenção competem (por exemplo, competição cruzada) para a ligação a miostatina com as Adnectinas antimioestatina particulares aqui descritas. Tais Adnectinas concorrentes podem ser identificadas com base na sua capacidade para inibir competitivamente a ligação a miostatina de Adnectinas aqui descritas em ensaios de ligação padrão de miostatina. Por exemplo, os ensaios ELISA padrão podem ser utilizados em que uma proteína recombinante é da miostatina imobilizada na placa, uma das Adnectinas é marcada por fluorescência e a capacidade de Adnectinas não marcadas para competir com a ligação da Adnectina marcada é avaliada.

[00170] Em uma modalidade, um formato de ELISA competitiva pode ser realizado para determinar se os sítios de miostatina duas Adnectinas antimioestatina se ligam sobrepondo Adnectina. Em um formato, Adnectina No. 1 é revestida sobre uma placa, que é então bloqueada e

lavada. A esta placa é adicionada quer miostatina sozinha, ou miostatina pré-incubada com uma concentração saturante de Adnectina No. 2. Após um período de incubação adequado, a placa é lavada e sondada com um anticorpo antimioestatina policlonal, tal como um anticorpo policlonal antimioestatina de cabra biotinilado (R&D Systems), seguido de detecção com conjugado streptavidina-HRP e os procedimentos de desenvolvimento de tetrametilbenzidina padrão. Se o sinal de OD é o mesmo com ou sem pré-incubação com Adnectina No. 2, então as duas Adnectinas se ligam independentemente uma da outra, e os seus sítios de ligação de Adnectina não se sobrepõem. Se, no entanto, o sinal de OD para poços que receberam misturas de miostatina / Adnectina No. 2 é menor do que para aqueles que receberam apenas a miostatina, em seguida, a ligação de Adnectina No. 2 é confirmada para bloquear a ligação de Adnectina No. 1 a miostatina.

[00171] Alternativamente, uma experiência semelhante é conduzida por ressonância de plasmon de superfície (SPR, por exemplo, BIAcore). Adnectina No. 1 é imobilizada sobre uma superfície do chip SPR, seguida de injeções de miostatina sozinha ou miostatina pré-incubada com uma concentração saturante de Adnectina No. 2. Se o sinal de ligação para misturas de miostatina / Adnectina No. 2 é o mesmo ou maior do que para miostatina sozinha, em seguida, as duas Adnectinas se ligam independentemente uma da outra, e os seus sítios de ligação de Adnectina não se sobrepõem. Se, no entanto, o sinal de ligação para misturas de miostatina / Adnectina No. 2 é menor do que o sinal de ligação para miostatina sozinha, em seguida, a ligação de Adnectina No. 2 é confirmada para bloquear a ligação de Adnectina No. 1 a miostatina. Uma característica destas experiências é a utilização de concentrações saturantes de Adnectina No. 2. Se miostatina não está saturada com Adnectina No. 2, então as conclusões acima não procedem. Experiências semelhantes podem ser utilizadas para determinar se

quaisquer duas proteínas de ligação de miostatina se ligam a sobreposição de sítios de ligação de Adnectina.

[00172] Ambos os ensaios acima exemplificados podem também ser realizados na ordem inversa onde Adnectina No. 2 é imobilizada e miostatina - Adnectina No.1 são adicionadas à placa. Alternativamente, Adnectina No. 1 e/ou No. 2 pode ser substituída por um anticorpo monoclonal e/ou proteína de fusão solúvel do receptor de Fc.

[00173] Em uma outra modalidade, a competição pode ser determinada utilizando um ensaio em sanduíche de HTRF, como descrito no Exemplo 4.

[00174] Em outras modalidades, a Adnectina de competição é uma Adnectina que se liga ao mesmo sítio de ligação de Adnectina sobre a miostatina como uma Adnectina antimioestatina particular aqui descrita. Técnicas de mapeamento padrão, tais como protease de mapeamento, análise mutacional, cristalografia de raios x e ressonância magnética nuclear bidimensional podem ser usadas para determinar se uma Adnectina se liga ao mesmo sítio de ligação de Adnectina como uma Adnectina de referência (vide, por exemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

[00175] Adnectinas antimioestatina de competição candidatas podem inibir a ligação de Adnectinas antimioestatina da invenção para a miostatina de pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou, pelo menos, 99%. A % de competição pode ser determinada utilizando os métodos descritos acima.

[00176] Em algumas modalidades, as moléculas que competem com as Adnectinas antimioestatina da invenção não precisam de ser uma Adnectina, mas pode ser qualquer tipo de molécula que se liga a miostatina, tais como, mas não limitados a, um anticorpo, uma molécula

pequena, um peptídeo, e semelhantes.

[00177] Em algumas modalidades, Adnectinas da invenção ligam-se a um sítio de ligação de Adnectina descontínuo em miostatina. Em algumas modalidades, os polipeptídeos se ligam a uma região dentro dos aminoácidos 55-66 da miostatina (SEQ ID NO: 3). Em algumas modalidades, os polipeptídeos se ligam uma região dentro dos aminoácidos 85-101 de miostatina (SEQ ID NO: 3). Em ainda outras modalidades, os polipeptídeos se ligam dentro de duas regiões aos aminoácidos 85-101 e 55-66 de miostatina (SEQ ID NO: 3).

[00178] Em algumas modalidades, os polipeptídeos da invenção não competem para a ligação a miostatina com ActRIIB. Em algumas modalidades, os polipeptídeos da invenção competem para a ligação a miostatina com ALK4 e/ou ALK5.

## **II. Sequências de Extensão**

[00179] Em certas modalidades, as moléculas de Adnectina antimioestatina da presente invenção podem ser modificadas para compreender uma sequência de extensão N-terminal e/ou uma extensão C-terminal. Por exemplo, uma sequência de MG pode ser colocada na extremidade N-terminal do <sup>10</sup>Fn3 definida por SEQ ID NO: 4. O M irá normalmente ser removido por cisão, deixando um G na extremidade N-terminal. Como alternativa, os 10 primeiros aminoácidos da Adnectinas antimioestatina mostrados na Tabela 2 podem ser substituídos com uma sequência N-terminal alternativa, referida aqui como extensões N-terminais, tal como mostrado na Tabela 7. Além disso, um M, G ou MG também pode ser colocado no terminal N de qualquer uma das extensões N-terminais apresentadas na Tabela 7. As Adnectinas antimioestatina aqui descritas podem também compreender sequências da cauda C-terminal alternativas, aqui referidas como sequências de extensão C-terminal. Por exemplo, as sequências de Adnectina antimioestatina mostradas na Tabela 2 podem ser truncadas

na treonina correspondente a T94 da SEQ ID NO: 4 (isto é, truncado após porção da sequência INYRT (SEQ ID NO: 168)). Tal versão truncada pode ser usada como moléculas terapêuticas sob a forma truncada, ou extensões no terminal C alternativas podem ser adicionadas após o resíduo de treonina. Sequências de extensão C-terminal de Exemplos estão apresentadas na Tabela 7. Adnectinas antimiostatina exemplares que compreendem sequências de extensão C-terminal são mostradas na Tabela 2 como SEQ ID NOs: 80-123. Por exemplo, SEQ ID NO: 80 (clone 1979\_B06) compreende extensão C-terminal EIDKPSQ que ocorre naturalmente (SEQ ID NO: 211), seguida de uma etiqueta His 6 (SEQ ID NO: 328). No entanto, deve ser entendido que a marcador His6 é completamente opcional.

[00180] Em certas modalidades, as sequências de extensão C-terminal (também denominadas "caudas"), compreendem os resíduos de E e D, e pode situar-se entre 8 e 50, 10 e 30, 10 e 20, 5 e 10, e 2 e 4 aminoácidos em comprimento. Em algumas modalidades, as sequências da cauda incluem ligantes à base de ED em que a sequência compreende repetições em tandem de ED. Em modalidades exemplares, a sequência de cauda compreende 2-10, 2-7, 2-5, 3-10, 3-7, 3-5, 3, 4 ou 5 repetições ED. Em certas modalidades, as sequências da cauda à base de ED podem também incluir resíduos de aminoácidos adicionais, tais como, por exemplo: EI, EID, ES, CE, EGS, e EGC. Tais sequências são baseadas, em parte, nas sequências da cauda de Adnectina conhecidas, tais como EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211), em que os resíduos D e K foram removidos. Em modalidades exemplares, a cauda a base de ED compreende um resíduo E, I ou EI antes da repetição ED.

[00181] Em outras modalidades, as sequências de N- ou C-terminais podem ser combinadas com sequências ligantes conhecidas (por exemplo, SEQ ID NO: 181-227 na Tabela 4) como necessário, quando

da concepção de uma molécula de fusão de Adnectina antimióstatina. Em algumas modalidades, as sequências podem ser colocadas na extremidade C-terminal do domínio  $^{10}\text{Fn3}$  para facilitar a ligação de uma porção farmacocinética. Por exemplo, um ligante contendo cisteína, tal como GSGC (SEQ ID NO: 189) pode ser adicionado ao C-terminal para facilitar a PEGilação dirigida a sítio sobre o resíduo de cisteína. Adnectinas antimióstatina exemplares que compreendem um ligante contendo cisteína são mostrados na Tabela 5 como SEQ ID NOs: 228-239.

### **III. Porções Farmacocinéticas**

[00182] Em um aspecto, a aplicação provê Adnectinas antimióstatina compreendendo ainda uma porção farmacocinética (PK). Farmacocinética melhorada pode ser avaliada de acordo com a necessidade terapêutica percebida. Muitas vezes, é desejável aumentar a biodisponibilidade e/ou aumentar o tempo entre as doses, possivelmente devido ao aumento do tempo que uma proteína permanece disponível no soro após a administração. Em alguns casos, é desejável melhorar a continuidade da concentração da proteína de soro ao longo do tempo (por exemplo, diminuir a diferença de concentração sérica da proteína logo após a administração e, pouco antes da administração seguinte). A Adnectina antimióstatina pode ser ligada a uma porção que reduz a taxa de depuração do polipeptídeo em um mamífero (por exemplo, camundongo, rato, ou humano) em mais do que duas vezes, mais do que três vezes, mais do que quatro vezes ou mais do que cinco vezes em relação à Adnectina antimióstatina não modificada. Outras medidas de farmacocinética melhorada podem incluir uma meia-vida no soro, que é frequentemente dividida em uma fase alfa e uma fase beta. Cada uma ou ambas as fases pode ser significativamente melhorada pela adição de uma fração apropriada. Por exemplo, a porção PK pode aumentar a meia-vida sérica do

polipeptídeo por mais do que 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 400, 600, 800, 1000% ou mais em relação ao domínio Fn3 sozinho.

[00183] As porções que a depuração lenta de uma proteína do sangue, aqui referida como "porções PK", incluem porções de polioxialquileno (por exemplo, polietileno glicol), açúcares (por exemplo, ácido siálico) e as porções de proteína bem toleradas (por exemplo, Fc e fragmentos e suas variantes, transferrina ou albumina de soro). A Adnectina antimioestatina pode também ser fundida com albumina ou um fragmento (porção) ou variante de albumina, tal como descrito na Publicação US No. 2007/0048282, ou pode ser fundida a um ou mais Adnectina de ligação albumina de soro, como aqui descrito.

[00184] Outras porções PK que podem ser utilizadas na invenção incluem aquelas descritas em Kontermann et al., (*Current Opinion in Biotechnology* 2011;22:868-76), aqui incorporada por referência. Estas porções PK incluem, mas não estão limitadas a, fusões de albumina do soro humano, conjugados de albumina de soro humano, ligantes de albumina de soro humano (por exemplo, Adnectina PKE, AlbuAb, ABD), fusões XTen, fusões PAS (ou seja, miméticos de PEG recombinantes com base nos três aminoácidos prolina, alanina, e serina), conjugados de carboidratos conjugados (por exemplo, amido de hidroxietila (HES)), glicosilação, ácido polissialico, e conjugados de ácidos graxos.

[00185] Por conseguinte, em algumas modalidades, a invenção proporciona uma Adnectina antimioestatina fundida com uma porção PK que é um açúcar polimérico. Em algumas modalidades, a porção PK é uma porção de polietileno glicol ou uma região Fc. Em algumas modalidades a porção PK é uma proteína de ligação de albumina do soro, tal como as descritas na Publicação US Nos. 2007/0178082 e 2007/0269422. Em algumas modalidades a porção PK é albumina de

soro humano. Em algumas modalidades, a porção PK é transferrina.

### ***Poliétileno glicol***

[00186] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina compreende polietilenoglicol (PEG). O PEG é um polímero solúvel em água bem conhecido, que está disponível comercialmente ou pode ser preparado por polimerização de abertura de anel de etileno glicol de acordo com métodos bem conhecidos na técnica (Sandler e Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, Nova Iorque, Vol. 3, páginas 138-161). O termo "PEG" é utilizado amplamente para abranger qualquer molécula de polietileno glicol, sem considerar o tamanho ou a modificação em uma extremidade do PEG, e pode ser representado pela fórmula:  $X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$ , em que  $n$  é 20 a 2300 e  $X$  é H ou uma modificação do terminal, por exemplo, um  $C_{1-4}$  alquila. PEG pode conter outros grupos químicos que são necessários para as reações, que resultam da síntese química da molécula de ligação; ou que atuam como um espaçador para a distância ideal de partes da molécula. Além disso, tal PEG pode consistir em uma ou mais cadeias laterais de PEG que estão ligadas entre si. PEGs com mais do que uma cadeia de PEG são chamados PEG multibraços ou ramificados. Os PEGs ramificados são descritos em, por exemplo, Publicado Europeu No. 473084A e Pat. US No. 5932462.

[00187] Uma ou mais moléculas de PEG podem estar ligadas em posições diferentes na proteína, e tal ligação pode ser conseguida por reação com aminas, tióis ou outros grupos reativos adequados. O grupo amina pode ser, por exemplo, uma amina primária encontrada no N-terminal de um polipeptídeo ou um grupo amina presente em um aminoácido, tal como lisina ou arginina. Em algumas modalidades, a porção PEG está ligada a uma posição sobre o polipeptídeo selecionado a partir do grupo consistindo em: a) os N-terminais; b) entre o N-terminal e a da cadeia beta mais N-terminal ou como um filamento tipo beta; c)

uma alça posicionada sobre uma face do polipeptídeo oposto ao sítio de ligação alvo; d) entre a extremidade C-terminal e a cadeia beta mais C-terminal ou cadeia tipo beta; e e) na extremidade C-terminal.

[00188] PEGuilação pode ser alcançada por PEGilação dirigida a sítio, em que um grupo reativo adequado é introduzido na proteína para criar um local onde PEGilação preferivelmente ocorre. Em algumas modalidades, a proteína é modificada para introduzir um resíduo de cisteína na posição desejada, permitindo PEGuilação dirigida ao local na cisteína. As mutações podem ser introduzidas em uma sequência de codificação de proteína para gerar resíduos de cisteína. Isto pode ser conseguido, por exemplo, por mutação de um ou mais resíduos de aminoácidos na cisteína. Os aminoácidos preferidos para mutação para um resíduo de cisteína incluem serina, treonina, alanina e outros resíduos hidrofílicos. De preferência, o resíduo a ser mutado para cisteína é um resíduo exposto na superfície. Os algoritmos são bem conhecidos na técnica para a previsão de acessibilidade à superfície de resíduos baseados na sequência primária ou uma proteína. Alternativamente, os resíduos de superfície podem ser previstos através da comparação das sequências de aminoácidos de polipeptídeos de ligação, dado que a estrutura de cristal do quadro, com base no qual os polipeptídeos de ligação são concebidos e desenvolvidos, foi resolvida (vide Himanen et al., *Nature* 2001; 414:933-8) e, assim, os resíduos expostos à superfície identificados. PEGilação de resíduos de cisteína pode ser realizada utilizando, por exemplo, PEG-maleimida, PEG-vinilsulfona, PEG-iodoacetamida, ou dissulfureto de PEG-ortopiridila.

[00189] A PEG é tipicamente ativada com um grupo adequado de ativação adequado para o acoplamento a um sítio desejado no polipeptídeo. Métodos de PEGuilação são bem conhecidos na técnica e descritos em Zalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modificação of Polypeptides" in Polyethylene Glycol

Chemistry: Biotechnical e Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992), e in Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16: 157-182

[00190] PEG pode variar amplamente em peso molecular e pode ser ramificada ou linear. Tipicamente, o peso molecular médio em peso de PEG é entre cerca de 100 Daltons a cerca de 150.000 Daltons. Pesos moleculares médios em peso exemplares para PEG incluem cerca de 20.000 Daltons, cerca de 40.000 daltons, cerca de 60.000 Daltons e cerca de 80.000 Daltons. Em certas modalidades, o peso molecular do PEG é 40.000 Daltons. Versões ramificadas de PEG possuindo um peso molecular total de qualquer um dos anteriores também podem ser usadas. Em algumas modalidades, o PEG tem duas ramificações. Em outras modalidades, o PEG tem quatro ramificações. Em uma outra modalidade, o PEG é um bis-PEG (NOF Corporation, DE-200MA), em que duas Adnectinas são conjugadas (vide, por exemplo, Exemplo 1 e ATI-1341 da Tabela 5).

[00191] Técnicas de separação e de purificação convencionais conhecidas na área podem ser utilizados para purificar Adnectinas antimiostatina PEGuiladas, tais como exclusão de tamanho (por exemplo, filtração em gel) e cromatografia de troca iônica. Os produtos também podem ser separados utilizando SDS-PAGE. Os produtos que podem ser separados incluem Adnectinas mono-, di-, tri-, poli-e não-PEGiladas, bem como livre de PEG. A percentagem de conjugados mono-PEG pode ser controlada através do agrupamento de frações mais amplas em torno do pico de eluição para aumentar a percentagem de mono-PEG na composição. Cerca de 90% de conjugados mono-PEG representam um bom equilíbrio de rendimento e atividade.

[00192] Em algumas modalidades, as Adnectinas antimiostatina PEGuiladas irão reter de preferência pelo menos cerca de 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% da atividade biológica

associada com a Adnectina antimioestatina não modificada. Em algumas modalidades, a atividade biológica refere-se à sua capacidade de se ligar a mioestatina, tal como avaliado por KD,  $k_{on}$ , ou  $k_{off}$ . Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina PEGuilada mostra um aumento na ligação de mioestatina em relação ao Adnectina antimioestatina não-PEGpeguilada.

[00193] Adnectinas antimioestatina modificadas por PEG exemplares são mostradas na Tabela 5.

***Domínio Fc de imunoglobulina (e fragmentos)***

[00194] Em algumas modalidades, a Adnectina antimioestatina está fundida com um domínio Fc de imunoglobulina, ou um fragmento ou variante do mesmo. Tal como aqui utilizado, uma "região Fc funcional" é um domínio Fc ou um fragmento do mesmo que conserva a capacidade de se ligar a FcRn. Em algumas modalidades, uma região Fc funcional se liga a FcRn, mas não possui a função efetora. A capacidade da região Fc ou um fragmento do mesmo de se ligar a FcRn pode ser determinada por ensaios de ligação padrão conhecidos na técnica. Em outras modalidades, a região Fc ou um fragmento do mesmo se liga a FcRn e possui pelo menos uma "função efetora" de uma região Fc nativa. Exemplos de "funções efetoras" incluem ligação Clq; citotoxicidade dependente de complemento (CDC); ligação de Receptor Fc; citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulação negativa de receptores de superfície celular (por exemplo, receptor das células B; BCR), etc. Tais funções efetoras requerem geralmente que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, uma Adnectina antimioestatina) e podem ser avaliadas utilizando vários ensaios conhecidos na técnica para avaliação de tais funções efetoras de anticorpos.

[00195] Uma "região Fc de sequência nativa" compreende uma

sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos de uma região Fc encontrada na natureza. Uma "região Fc variante" compreende uma sequência de aminoácidos que difere de uma região Fc de sequência nativa em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. De preferência, a região Fc variante tem pelo menos uma substituição de aminoácidos em comparação com uma região Fc de sequência nativa ou com a região Fc de um polipeptídeo progenitor, por exemplo, a partir de cerca de uma a cerca de dez substituições de aminoácidos, e preferivelmente de cerca de uma a cerca de cinco substituições de aminoácidos em uma região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipeptídeo progenitor. A região Fc variante aqui irá, de preferência possuir pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com uma região Fc de sequência nativa e/ou com uma região Fc de um polipeptídeo progenitor, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de identidade com esta sequência, mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% de identidade com esta sequência.

[00196] Em uma modalidade exemplar, o domínio Fc é derivado de uma subclasse IgG1, no entanto, outras subclasses (por exemplo, IgG2, IgG3, e IgG4) podem também ser usadas. Abaixo é mostrada a sequência de um domínio Fc de imunoglobulina IgG1 humana:

[00197] DKTHTCPPCPAPELLGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS  
PGK (SEQ ID NO: 169)

[00198] A sequência de dobradiça núcleo está sublinhada, e as regiões CH2 e CH3 estão em texto regular. Deve ser entendido que a lisina C-terminal é opcional.

[00199] A fusão pode ser formada pelo acoplamento de uma

Adnectina antimioestatina a uma ou outra extremidade da molécula de Fc, ou seja, arranjos de Adnectina Fc-antimioestatina ou Adnectina-Fc antimioestatina. Em certas modalidades, a Adnectina Fc e antimioestatina são fundidas através de um ligante. Sequências ligantes exemplares incluem GAGGGGSG (SEQ ID NO: 181), EPKSSD (SEQ ID NO: 182), D, ESPKAQASSVPTAQQAEGLA (SEQ ID NO: 183), ELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO: 184), GQPDEPGGS (SEQ ID NO: 185), GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 186), ELQLEESAAEAQEGELE (SEQ ID NO: 187), GSGSG (SEQ ID NO: 188), GSGC (SEQ ID NO: 189), AGGGGSG (SEQ ID NO: 190), GSGS (SEQ ID NO: 191), QPDEPGGS (SEQ ID NO: 192), GSGSGS (SEQ ID NO: 193), TVAAPS (SEQ ID NO: 194), KAGGGGSG (SEQ ID NO: 195), KGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 196), KQPDEPGGS (SEQ ID NO: 197), KELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO: 198), KTVAAPS (SEQ ID NO: 199), KAGGGGSGG (SEQ ID NO: 200), KGSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO: 201), KQPDEPGGSG (SEQ ID NO: 202), KELQLEESAAEAQDGLDG (SEQ ID NO: 203), KTVAAPSG (SEQ ID NO: 204) AGGGGSGG (SEQ ID NO: 205), AGGGGSG (SEQ ID NO: 206), GSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO: 207), QPDEPGGSG (SEQ ID NO: 208), e TVAAPSG (SEQ ID NO: 209).

[00200] Em algumas modalidades, a região Fc utilizada na fusão de Adnectina antimioestatina compreende a região de dobradiça de uma molécula de Fc. Tal como aqui usado, a região de "dobradiça" compreende os resíduos de dobradiça núcleo que abrangem as posições 1-16 da SEQ ID NO: 169 (DKTHTCPPCPAPPELLG; SEQ ID NO: 170) da região Fc de IgG1. Em certas modalidades, a fusão de Adnectina-Fc antimioestatina adota uma estrutura multimérica (por exemplo, dímero), devido, em parte, aos resíduos de cisteína nas posições 6 e 9 da SEQ ID NO: 169 dentro da região de dobradiça. Em outras modalidades, a região de dobradiça, tal como aqui utilizada, pode

incluir ainda os resíduos da região CH1 e CH2, que flanqueiam a sequência de dobradiça núcleo, como mostrado na SEQ ID NO: 169. Em ainda outras modalidades, a sequência de dobradiça é GSTHTCPPCPAPELLG (isto é, sequência da dobradiça para PRD-932; SEQ ID NO: 180).

[00201] Em algumas modalidades, a sequência de dobradiça pode incluir substituições que conferem propriedades farmacocinéticas, biofísicas, e/ou biológicas desejável. Algumas sequências de dobradiça exemplares incluem EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 171; região de dobradiça núcleo sublinhada), EPKSSDKTHTCP  
PCPAPELLGGSS (SEQ ID NO 172; região de dobradiça núcleo sublinhada), EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 173; região de dobradiça núcleo sublinhada), DKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 174; região de dobradiça núcleo sublinhada), e DKTHTC  
PPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 175; região de dobradiça núcleo sublinhada). Em uma modalidade, o resíduo P na posição 18 da SEQ ID NO: 169 foi substituído por S para a ablação da função efetora Fc; esta substituição é exemplificada em dobradiças tendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 172, 173, e 175. Em uma outra modalidade, os resíduos nas posições DK 1-2 de SEQ ID NO: 169 foram substituídos por GS para remover um local de clipe potencial; esta substituição é exemplificada na SEQ ID NO: 173. Em uma outra modalidade, o C na posição 103 da SEQ ID NO: 176, que corresponde à região constante da cadeia pesada de IgG1 humana (isto é, os domínios CH1-CH3), foram substituídos por S para impedir a formação de uma ligação inadequada de cisteína na ausência de uma cadeia leve; esta substituição é exemplificada na SEQ ID NOs: 171-173.

[00202] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV  
NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK

DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
 HEALTHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 176)

[00203] Em certas modalidades, uma fusão de Adnectina-Fc antimioestatina pode ter as seguintes configurações: 1) Adnectina-dobradiça-Fc antimioestatina, ou 2) Adnectina dobradiça-Fc antimioestatina. Portanto, qualquer Adnectina antimioestatina da presente invenção pode ser fundida com uma região Fc compreendendo uma sequência de dobradiça de acordo com estas configurações. Em algumas modalidades, um ligante pode ser usado para unir a Adnectina antimioestatina à porção dobradiça-Fc, por exemplo, uma proteína de fusão exemplar pode ter a configuração Adnectina-ligante-dobradiça-Fc antimioestatina ou Adnectina dobradiça-Fc-ligante-antimioestatina. Além disso, dependendo do sistema em que o polipeptídeo de fusão é produzido, uma sequência líder pode ser colocada no N-terminal do polipeptídeo de fusão. Por exemplo, se a fusão é produzida em um sistema de mamífero, uma sequência líder, tal como METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 177) pode ser adicionada ao N-terminal da molécula de fusão. Se a fusão é produzida em *E. coli*, a sequência de fusão irá ser precedida por uma metionina.

[00204] A seguinte sequência exemplifica um construto Adnectina-dobradiça-Fc antimioestatina:

[00205] **GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYRITYGE**  
 TGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTTTKVIHY  
 KPISINYRTEIEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM  
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK

TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK (PRD-1171; SEQ ID NO: 253). A sequência líder está em  
negrito, a sequência de Adnectina antimioestatina está em itálico, e a  
região da dobradiça está sublinhada. Deve ser entendido que a lisina C-  
terminal é opcional.

[00206] Aqui, o domínio Fc compreende as regiões CH2 e CH3 de  
IgG1 humano como se segue:

[00207] **VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY**  
*VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV*  
*SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG*  
*FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW*  
*QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 178) e a  
sequência de dobradiça *DKTHTCPPCPAPELLG* (SEQ ID NO: 170).

[00208] A sequência a seguir exemplifica um construto de Adnectina  
Fc-antimioestatina:

[00209] **DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT**  
*CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV*  
*LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP*  
*PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD*  
*SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP*  
*ELQLEESAEEAQEGELE****GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHQG***  
*KANYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAV*  
*TVTDTGYLKYKPISINYRTEI* (PRD-1474; SEQ ID NO: 273). A região de  
dobradiça é sublinhada, a sequência líder é em negrito, e a sequência  
de Adnectina antimioestatina está em itálico.

[00210] Aqui, o domínio Fc compreende as regiões CH2 e CH3 de  
IgG1 humano como se segue:

[00211] **VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY**  
*VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK*  
*VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL*

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 179) e  
a sequência de dobradiça DKTHTCPPCPAPPELLG (SEQ ID NO: 170).

[00212] Fusões de Adnectina-Fc antimiostatina exemplares e fusões de Adnectina Fc-antimiostatina são mostradas na Tabela 6 (SEQ ID NOs: 252-273). Todas as sequências podem começar com uma metionina ou uma sequência de comando de mamífero (por exemplo, SEQ ID NO: 177).

### ***Adnectinas***

[00213] Em algumas modalidades a porção PK é outra Adnectina específica, por exemplo, para uma proteína de soro (por exemplo, albumina do soro humano), conforme descrito no documento US 2012/0094909, aqui incorporado por referência na sua totalidade. Outras porções PK que podem ser utilizadas com as Adnectinas da invenção são reveladas em Kontermann et al. (*Current Opinion in Biotechnology* 2011; 22: 868-76), como discutido acima. A título de exemplo, tais porções PK baseadas em Adnectina podem ser direta ou indiretamente ligadas a uma Adnectina antimiostatina através de um polipeptídeo ligante. Os ligantes adequados para unir domínios Fn3 são aqueles que permitem que os domínios separados dobrem independentemente um do outro e formem uma estrutura tridimensional que permite a ligação a uma molécula alvo de elevada afinidade. Ligantes polipeptídicos exemplares incluem PSTSTST (SEQ ID NO: 210), EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211), e ligantes GS, tais como GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 213) e multímeros dos mesmos. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante baseado em glicina-serina. Estes ligantes compreendem glicina e serina e podem situar-se entre 8 e 50, 10 e 30, e 10 e 20 aminoácidos de comprimento. Exemplos de ligantes incluem aqueles tendo uma sequência de aminoácidos (GS)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 215), G(GS)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 216), e G(GS)<sub>7</sub>G (SEQ ID NO:

217). Outros ligantes contêm ácido glutâmico, e incluem, por exemplo, (GSE)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 218) e GGSEGGSE (SEQ ID NO: 219). Outros ligantes exemplares incluem glicina-serina (GS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 212), (GGGGS)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 220), (GGGGS)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 221), e (GGGGS)<sub>3</sub>G (SEQ ID NO: 222). Em algumas modalidades, o ligante é um ligante baseado em glicina-prolina. Estes ligantes compreendem glicina e prolina e podem situar-se entre 3 e 30, 10 e 30, e 3 e 20 aminoácidos de comprimento. Exemplos incluem ligantes que possuem uma sequência de aminoácidos (GP)<sub>3</sub>G (SEQ ID NO: 223), (GP)<sub>5</sub>G (SEQ ID NO: 224), e GPG. Em outras modalidades, o ligante pode ser um ligante baseado em prolina-alanina tendo entre 3 e 30, 10 e 30, e 3 e 20 aminoácidos de comprimento. Exemplos de ligantes baseados em prolina e alanina incluem, por exemplo, (PA)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 225), (PA)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 226) e (PA)<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 227). Comprimento de ligante ideal e composição de aminoácidos podem ser determinados por experimentação de rotina, considerando os ensinamentos aqui proporcionados. Em algumas modalidades, uma Adnectina antimioestatina está ligada, por exemplo, a uma Adnectina anti-HSA através de um polipeptídeo ligante possuindo um sítio de protease que é clivável por uma protease no sangue ou tecido alvo. Tais modalidades podem ser usadas para liberar uma Adnectina antimioestatina para melhor entrega ou propriedades terapêuticas ou produção mais eficiente.

[00214] Ligantes ou espaçadores adicionais, podem ser introduzidos no N-terminal ou C-terminal de um domínio Fn3 entre o domínio Fn3 e o ligante de polipeptídeos.

[00215] Em algumas modalidades, uma Adnectina antimioestatina pode ser direta ou indiretamente ligada, por exemplo, a uma Adnectina anti-HSA através de um ligante polimérico. Os ligantes poliméricos podem ser utilizados para variar de forma ideal a distância entre cada

componente de fusão para criar uma proteína de fusão com uma ou mais das seguintes características: 1) o impedimento estérico reduzido ou aumentado da ligação de um ou mais domínios de proteínas quando da ligação a uma proteína de interesse, 2) maior estabilidade proteica ou solubilidade, 3) diminuição da agregação de proteínas, e 4) maior avidéz ou afinidade global da proteína.

[00216] Em algumas modalidades, uma Adnectina antimióstatina está ligada, por exemplo, a uma Adnectina anti-HSA, através de um polímero biocompatível, tal como um açúcar polimérico. O açúcar polimérico pode incluir um sítio de clivagem enzimática que é clivável por uma enzima no sangue ou no tecido alvo. Tais modalidades podem ser usadas para liberar uma Adnectina antimióstatina para melhor entrega ou propriedades terapêuticas ou produção mais eficiente.

[00217] Um sumário de monoAdnectinas e suas formas modificadas pela porção PK correspondentes (por exemplo, fusões PEGuiladas e Fc) é apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3**

Mono-Adnectina <sup>a</sup>	Cisteína mutante [modificação] <sup>b</sup>	X-ligante-Fc <sup>c</sup>	Fc-ligante-X <sup>d</sup>
1979_B06 (SEQ ID NO: 80)	ATI-1107 (SEQ ID NO: 229) [40k 2-br]		
2062_G02 (SEQ ID NO: 81)	ATI-1106 (SEQ ID NO: 228) [40k 2-br]		
2522_C09 (SEQ ID NO: 82)			
2523_G06 (SEQ ID NO: 83)			
2524_C11 (SEQ ID NO: 84)			
2524_D09 (SEQ ID NO: 85)	ATI-1275 (SEQ ID NO: 231) [NEM]; ATI-1276 (SEQ ID NO: 231) [40k 2-br]		
2524_E10 (SEQ ID NO: 86)			
2524_H05 (SEQ ID NO: 87)			
2524_H11 (SEQ ID NO: 88)			
2525_B01 (SEQ ID NO: 89)			
2525_D02 (SEQ ID NO: 90)	ATI-1267 (SEQ ID NO: 230) [NEM]; ATI-1266 (SEQ ID NO: 230) [40k 2-br]		
2525_D05 (SEQ ID NO: 91)	ATI-1277 (SEQ ID NO: 232) [NEM]; ATI-1278 (SEQ ID NO: 232) [40k 2-br]		PRD-932 [L1] (SEQ ID NO: 252)

2525_F07 (SEQ ID NO: 92)			
2987_A06 (SEQ ID NO: 93)			
2987_B04 (SEQ ID NO: 94)			
2987_B09 (SEQ ID NO: 95)			
2987_C02 (SEQ ID NO: 96)			
2987_D05 (SEQ ID NO: 97)			
2987_E03 (SEQ ID NO: 98)			
2987_E08 (SEQ ID NO: 99)			
2987_F01 (SEQ ID NO: 100)			
2987_F06 (SEQ ID NO: 101)			
2987_G04 (SEQ ID NO: 102)			
2987_G09 (SEQ ID NO: 103)			
2987_H02 (SEQ ID NO: 104)			
2987_H07 (SEQ ID NO: 105)	ATI-1310 (SEQ ID NO: 233) [nenhum]; ATI-1340 (SEQ ID NO: 233) [NEM]; ATI-1338 (SEQ ID NO: 233) [40k 2-br]; ATI-1359 (SEQ ID NO: 233) [no His, 40k 2-br]; ATI-1339 (SEQ ID NO: 233) [40k 4-br]; ATI-1341 (SEQ ID NO: 233) [20k bis-PEG]	PRD-1171[L2] (SEQ ID NO: 253); PRD-1173[L3] (SEQ ID NO: 254); PRD-1174[L4] (SEQ ID NO: 255)	PRD-1175[L1] (SEQ ID NO: 256); PRD-1177[L5] (SEQ ID NO: 257); PRD-1178[L6] (SEQ ID NO: 258); PRD-1180[L7] (SEQ ID NO: 259); PRD-1471[L8] (SEQ ID NO: 270)
3006_A10 (SEQ ID NO: 106)			
3007_B08 (SEQ ID NO: 107)			
3007_C09 (SEQ ID NO: 108)			
3007_C10 (SEQ ID NO: 109)			
3008_A03 (SEQ ID NO: 110)			
3008_B08 (SEQ ID NO: 111)			
3008_D04 (SEQ ID NO: 112)			
3008_F01 (SEQ ID NO: 113)			
3008_G01 (SEQ ID NO: 114)			
3008_G03 (SEQ ID NO: 115)			
3115_D04 (SEQ ID NO: 116)	ATI-1375 (SEQ ID NO: 235) [40k 2-br]	PRD-1301[L2] (SEQ ID NO: 265)	PRD-1284[L5] (SEQ ID NO: 260)
3115_E06 (SEQ ID NO: 117)	ATI-1376 (SEQ ID NO: 236) [40k 2-br]	PRD-1302[L2] (SEQ ID NO: 266)	PRD-1285[L5] (SEQ ID NO: 261); PRD-1472[L8] (SEQ ID NO: 271)
3116_A06 (SEQ ID NO: 118)	ATI-1379 (SEQ ID NO: 239) [40k 2-br]; ATI-1523 (SEQ ID NO: 239) [NEM]	PRD-1305[L2] (SEQ ID NO: 269)	PRD-1288[L5] (SEQ ID NO: 264); PRD-1474[L8] (SEQ ID NO: 273)
3116_A07 (SEQ ID NO: 119)	ATI-1377 (SEQ ID NO: 237) [40k 2-br]	PRD-1303[L2] (SEQ ID NO: 267)	PRD-1286[L5] (SEQ ID NO: 262); PRD-1473[L8] (SEQ ID NO: 272)
3116_C01 (SEQ ID NO: 120)			

3116_C06 (SEQ ID NO: 121)			
3116_H06 (SEQ ID NO: 122)			
3146_A08 (SEQ ID NO: 123)	ATI-1378 (SEQ ID NO: 238) [40k 2-br]	PRD-1304[L2] (SEQ ID NO: 268)	PRD-1287[L5] (SEQ ID NO: 263)

[00218] <sup>a</sup> MonoAdnectinas não modificadas têm uma sequência de Adnectina núcleo precedida por uma sequência de extensão N-terminal (MGVSDVPRDL; SEQ ID NO: 306) e seguida por uma cauda C-terminal (EIDKPSQHHHHH; SEQ ID NO: 325), como mostrado na Tabela 2. A sequência de Adnectina núcleo corresponde à sequência de monoAdnectina ausente nas sequências de extensão N-terminal e cauda e C-terminal.

[00219] <sup>b</sup> Adnectinas com cisteína mutantes tem a sequência de Adnectina núcleo da monoAdnectina na primeira coluna, e são precedidas por uma sequência de extensão N-terminal (MGVSDVPRDL; SEQ ID NO: 306) e seguida por uma cauda C-terminal (GSGC [Modificação] HHHHHH; SEQ ID NO: 326 ou EGSGC [Modificação] HHHHHH; SEQ ID NO: 327), como se mostra na Tabela 5.

[00220] <sup>c</sup> Adnectinas com uma porção Fc no C-terminal tem a sequência de Adnectina núcleo da monoAdnectina na primeira coluna, que é precedida por uma sequência de extensão N-terminal (GVSDVPRDL; SEQ ID NO: 307), e seguida por uma cauda C-terminal (EI), que é seguida por uma sequência de ligante (Tabela 4) e a sequência de região Fc, tal como descrito na Tabela 6.

[00221] <sup>d</sup> Adnectinas com uma porção Fc no N-terminal tem uma sequência de região Fc, que é precedida por uma sequência de dobradiça N-terminal e seguida por um ligante (Tabela 4) e a sequência de Adnectina núcleo da monoAdnectina na primeira coluna, que é precedida por uma sequência de extensão N-terminal (GVSDVPRDL; SEQ ID NO: 307), e seguida por uma cauda C-terminal (EI), como mostrado na Tabela 6.

[00222] As SEQ ID NOs de ligantes exemplares da invenção são



Clone	Sequência de Aminoácido	Sequência de Ácido Nucleico
ATI-1106 [40K 2-ramificação PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVSP RGRARYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGSTATISGLKPGVDYITIVYAVTIYRDG MSHHDPIISINYRTGSGC [Modificação] HHHHHH (SEQ ID NO: 228)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGC CTGCTGATCAGCTGGGTTTCTCCGCGTGG TCGTGCTCGATATTACCGCATCACTTACG GCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCA GGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTTCTA CAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAACCTGG CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTG TCACTATCTACCGTGACGGTATGTCTCAT CATGACCCAATTTCCATTAATTACCGCAC AGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCAT CAC (SEQ ID NO: 240)
ATI-1107 [40K 2-ramificação PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVSLP HAGHVNYRITYGETGGNSPVQEFTV PGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTLT KSQMIHYMPISINYRTGSGC [Modificação] HHHHHH (SEQ ID NO: 229)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGC CTGCTGATCAGCTGGTCTTGCCGCGATGC TGGTCATGTGAATATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTG CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTCTGACTAAATCTCAGATGATCCAT TACATGCCAATTTCCATTAATTACCGCACA GGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCA C (SEQ ID NO: 241)
ATI-1266 [40K 2-ramificação PEG] ATI-1267 [N-etilmaleimida]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVTLPH AGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTITTS VILYKPIISINYRTEGSGC[Modificação] HHHHHH (SEQ ID NO: 230)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGC CTGCTGATCAGCTGGACTTTGCCGCGATGC TGGTCGTGCGCACTATTACCGCATCACTT ACGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGT CCAGGAGTTCACTGTGCCTGGGCGGGGT GTTACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAACC TGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATG CTGTCACTGTGACGACAACTTCGGTGATC CTTTACAAGCCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCA CCATCAC (SEQ ID NO: 242)
ATI-1275 [N-etilmaleimida] ATI-1276 [40K 2-ramificação PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVLPY PAHMNYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGLTATISGLKPGVDYITIVYAVTLTKSQI LHHRPISINYRTEGSGC[Modificação]HH HHHH (SEQ ID NO: 231)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGC CTGCTGATCAGCTGGTACTCCCCTATCC TGCGCATATGAATATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTG CAGGAGTTCACTGTGCCTGGGCGGGGTC TGACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAACCT GGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGC TGTCCTCTGACAAAATCTCAGATTCTCCA TCATAGGCCAATTTCCATTAATTACCGCAC AGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACC ATCAC (SEQ ID NO: 243)
ATI-1277 [N-etilmaleimida] ATI-1278 [40K 2-ramificação PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVSLP YAGHLNYRITYGETGGNSPVQEFTV PGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTLTKS QLIHYMPISINYRTEGSGC[Modificação]H HHHHH (SEQ ID NO: 232)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGC CTGCTGATCAGCTGGTCTCTTCTTATGC TGGTCATCTAAACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTG CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT GACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTCTGACTAAGTCTCAGCTGATACA TTACATGCCAATTTCCATTAATTACCGCAC AGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACC ATCAC (SEQ ID NO: 244)

<p>ATI-1310 [livre de Cys]  ATI-1338 [40K 2-ramificação PEG]ATI-1339 [40K 4-ramificação PEG]ATI-1340 [N-etilmaleimida]ATI-1341 [20K Bis-PEG]</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTLPH  AGRAHYRITYGETGGNSPVQFTVPG  RGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTVTTTK  VIHYKPISINYRTEGSGC[Modificação]  HHHHHH (SEQ ID NO: 233)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT  GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGC  CTGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGC  AGGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTA  TGGTGAACCCGGTGGTAATAGTCCGGTTC  AGGAATTCACCGTTCGGGTCTGGTGT  ACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGG  GTGTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAG  TTACCGTTACCACCACAAAGTGATTCATT  ATAAACCGATTTCATTAATTACCGCACAG  AAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCAT  CAC (SEQ ID NO: 245)</p>
<p>ATI-1359 [40K 2-ramificação PEG]</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTLPH  AGRAHYRITYGETGGNSPVQFTVPG  RGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTVTTTK  VIHYKPISINYRTEGSGC[Modificação]HH  HHHH (SEQ ID NO: 234)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT  GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGC  CCTGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCA  TGCAGGTCGTGCACATTATTATCGTATTA  CCTATGGTGAACCCGGTGGTAATAGTCC  GGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGTCTG  GGTGTACCAGCAACCATTAGCGGTCTGA  AACCGGGTGTGATTACACCATTACCGTT  TATGCAGTTACCGTTACCACCACAAAG  TGATTCATTATAAACCGATTTCATTAATT  ACCGAACAGAAGGTAGCGGTTGC (SEQ ID  NO: 246)</p>
<p>ATI-1375 [40K 2-ramificação PEG]</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPR  GLARYRITYGETGGNSPVQFTVFG  GTTATISGLKPGVDYITIVYAVTIDRDGT  RSFDPISINYRTEGSGC[Modificação]HH  HHHH (SEQ ID NO: 235)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT  GGAAGTTGTTGCTGCCACCCACCAGC  CTGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGAGAG  GTCTGGCTCGATATTACCGCATCACTTAC  GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC  CAGGAGTTCACTGTGTTCCGGTCTGGTAC  CACAGCTACCATCAGCGGCCTAAACCT  GGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGC  TGTCATATCGACCGTGACGGTACCCGC  AGCTTCGACCAATTTCCATTAATTACCG  CACAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCAC  CACCATCAC (SEQ ID NO: 247)</p>
<p>ATI-1376 [40K 2-ramificação PEG]</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAP  AGLARYRITYGETGGNSPVQFTVVG  RGNTATISGLKPGVDYITIVYAVTIFRDG  PVTWDPISINYRTEGSGC[Modificação]  HHHHHH (SEQ ID NO: 236)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACC  TGGAAAGTTGTTGCTGCCACCCACCAGC  CCTGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGC  TGGTCTGGCTCGATATTACCGCATCACT  TACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTG  TCCAGGAGTTCACTGTGGTCCGGTCTGG  TAACACAGCTACCATCAGCGCCTTAAAC  CTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTAT  GCTGTCACTATCTTCCGTGACGGTCCCG  TCACCTGGGACCAATTTCCATTAATTAC  CGCACAGAAGGTAGCGGTTGCCACCAT  CACCACCATCAC (SEQ ID NO: 248)</p>
<p>ATI-1377 [40K 2-ramificação PEG]</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAP  KGLARYRITYGETGGNSPVQFTVVG  RGNTATISGLKPGVDYITIVYAVTIFRD  GPVTWDPISINYRTEGSGC[Modificação]  HHHHHH (SEQ ID NO: 237)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT  GGAAGTTGTTGCTGCCACCCACCAGC  CTGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGAAGG  GTCTGGCTCGATATTACCGCATCACTTAC  GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC  AGGAGTTCACTGTGGTCCGGTCTGGTAAAC  ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG  CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT  CACTATCTTCCGTGACGGTCCCGTACCT  GGGACCAATTTCCATTAATTACCGCACA  GAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCA  TCAC (SEQ ID NO: 249)</p>

ATI-1378 [40K 2-ramificação PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISW/SLPN PGNAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVTDG FITYKPISINYRTEGSGC[Modificação] HHHHHH (SEQ ID NO: 238)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACC TGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAG CCTGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAAT CCGGGTAACGCCATTATTACCGCATCAC TTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCG TGGTGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTG TGATGCTGTCACTGTACTGACACAGG TTTCATCACGTACAACCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGCCAC CATCACCACCATCAC (SEQ ID NO: 250)
ATI-1379 [40K 2-ramificação PEG] ATI-1523 [N-etilmaleimida]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISW/SLP HQGKANYRITYGETGGNSPVQEFTVP GRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVTDG GYLKYKPISINYRTEGSGC[Modificação] HHHHHH (SEQ ID NO: 239)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGC CTGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCA AGGTAAGCCAATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTTACTGATACAGGGTACCTCAA GTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCAC AGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACC ATCAC (SEQ ID NO: 251)

[00224] A SEQ ID NOs de Adnectinas antimióstina exemplares fundidas com Fc da invenção são apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6**

Adnectinas Antimióstina fundidas com Fc					
SEQUÊNCIA					
Clone	Sequência de Aminoácido	Domínio N-terminal	Ligante	Domínio C-terminal	Sequência de Ácido Nucleico
PRD-932	EPKSSGSTHTCP PCPAPELLGG SSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTPPVL DSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGA GGGGSGGVSD VPRDLEVVA	EPKSSGSTHTCP PCPAPELLGGSS VFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYT QKSLSLSP (SEQ ID NO: 274)	GAGGGGSG (SEQ ID NO: 181)	GVSDVPRDLEVVA ATPTSLISW/SLPYA GHLNYYRITYGETGGN SPVQEFTVPG RGVTATISGLKPGV DYTITVYAVTLTKSQ LIHYMPISINYRTEI (SEQ ID NO: 282)	GAGCCCAAATC TAGCGGGTCTGA CTCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGAAC TCCTGGGGGA AGCTCAGTCTT CCTCTCCCCC CAAACCCAAG GACACCCCAT GATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCTGAGGT CAAGTCAACT GGTACGTGGAC GGCGTGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC

	TPTSLISWSPY AGHLNYR ITYGETGGNSP VQEFTVPGRG VTATISGLKPGV DYTITVYAVTLT KSQLIHYMPIS INYRTEI (SEQ ID NO: 252)			CGTGTGGTCAG CGTCCTCACCG TCCTGCACCAG GACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTA CAAGTGCAA GGTCTCCAACA AAGCCCTCCA GCCCCATCGAG AAAACCATCTC CAAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAGG TGACACCCTG CCCCATCCCGG GATGAGCTGACC AAGAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAAA GGCTTCTATCC CAGCGACATCG CCGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCTG GACTCCGACGG CTCCTTCTTCC TCTACAGCAAG CTCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGGG GAACGTCTTCT CATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAAC CACTACACGCAG AAGAGCCTC TCCCTGTCTCCC GGCGCCGGAGG CGGCGGATCC GGTGGAGTTTCT GATGTGCCGCG CGACCTGGAAG TGTTGCTGCCA CCCCACCAG CCTGCTGATCAG CTGGTCTCTTC CTTATGCTGGTC ATCTAAACTATT ACCGCATCACTT ACGGCGAAACAG GAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAG TCACTGTGCC
--	---	--	--	---

					TGGTCGTGGTGT GACAGCTACCA TCAGCGGCCTT AAACCTGGCGT TGATTATACCAT CACTGTGTATGCT GTCACTCTG ACTAAGTCTCA GCTGATACATTA CATGCCAATTTTC CATTAAATTACCG GACCGAAATC (SEQ ID NO: 284)
PRD-1171	GVSDVPRDLE VVAATPTSLNIS WTLPHAGRAH YYRITYGETGGNS PVQEFTVP GRGVTATISGL KPGVDYTITV YAVTVTTTKVI HYKPISINYRTE IEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKC KVSNKAL PAPIEKTISKAKGQ PREPQVY TLPPSRDEL KNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSKL TVDKSRWQQ GNVFSCVMHEA LHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 253)	GVSDVPRDLEVV AATPTSLNISWTL PHAGRAHYRITY GETGGNSPVQEF TVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYA VTVTTTKVIHYKPI SINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVWV DVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKL TVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCG ACGTGCCCGGGG ATCTAGAAGTGGT GGCTGTACCCC CACAGCTTGCT GATCTCCTGGAC ACTGCCTCACGC TGGCCGGGCTCA TACTATAGAATT ACCTACGGGGAG ACAGCGGGAAC TCTCCGTGCAG GAATTCACCGTG CCTGAAGGGGG GTGACTGCCACC ATCAGTGGGCTG AAGCCAGGAGTG GACTACACAATTA CCGTGTACGCTG TGACTGTGACCA CAACTAAAGTGAT CCACTACAAACC CATCTCTATTAAT TATCGGACCG AAATTGAGCCTA AGAGCTCCGACA AAACCCACACAT GCCACCTTGTC CAGCCCCGAA CTGCTGGGCGG CCCTTCAGTCTT CCTCTCCCCC CAAACCCAAAG GACACCCTCA TGATCTCCCGG ACCCCTGAGGT CACATGCGTGG TGGTGGACGTGA GCCACGAAGAC CCTGAGGTCAA GTTCAACTGGT ACGTGACCGG

					CGTGGAGGTG CATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGTG TGGTCAGCGTC CTCACCGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAGAA AACCATCTCCA AAGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGTG TACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGAC CAAGAACCAGG TCAGCCTGACC TGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCC CAGCGACATCG CCGTGGAGTGG GAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAA CAACTACAAGAC CACGCCTCC CGTGTGGACT CCGACGGCTCC TTCTCCTCTAC AGCAAAGCTCAC CGTGGACAAGA GCAGGTGGCAG CAGGGGAACGT CTTCTCATGCTC CGTGATGCATG AGGCTCTGCAC AACCACTACAC GCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTC CCGGGAAA (SEQ ID NO: 285)
PRD-1173	GVSDVPRDLE VVAATPTSLIS WTLPHAGRAH YYRITYGETGGNS PVQEFTV PGRGVTATIS GLKPGVDYTIT VYAVTVTTTKVI	GVSDVPRDLE VVAATPTSLLI SWTLPHAGRA HYRITYGETGGN SPVQEFTV PGRGVTATISGLK PGVDYTIT VYAVTVTTTKVI	D	KTHTCPPEPELL GGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKA	GGCGTGAGCGA CGTGCCCCGGG ATCTAGAAGTG GTGGCTGCTACC CCCACAAGCTTG CTGATCTCCTG GACACTGCCT CACGCTGGC

	HYKPISINYRT EIDKTHTCP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVL HQDWLNGKEYKC KVSINKALPAPIEK TISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 254)	HYKPISINYRTE I (SEQ ID NO: 275)		LPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	CGGGCTCATT ACTATAGAATT ACCTACGGGGA GACAGCGGGG AACTCTCCCGT GCAGGAATTCA CCGTGCCTGGA AGGGGCGTGAC TGCCACCATCA GTGGGCTGAAG CCAGGAGTGGA CTACACAATTAC CGGTACGCTG TGAAGTGACC ACAACTAAAG TGATCCACTA CAAACCCATCT CTATTAATTATC GGACCGAAAT TGACAAGACC CACACATGCC ACCTTGCCAG CCCCGAGCTGC TGGGCGGCC TTCAGTCTTCT CTTCCCCCA AAACCAAGGA CACCTCATGA TCTCCCGACC CCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACCC TGAGGTCAAGT TCAACTGGTAC GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAGA CAAAGCCCGG GAGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGGTC AGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTGG CTGAATGGCAA GGAGTACAAGT GCAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAAAC CATCTCAAAGC CAAAGGGCAGCC CCGAGAACC ACAGGTGTACA CCCTGCCCCCA
--	--	------------------------------------	--	--	---

					TCCCGGGATGA GCTGACCAAGA ACCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGGC TTCTATCCCAG CGACATCGCCG TGGAGTGGGAG AGCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGAC CACGCCTCCCG TGTTGGACTCC GACGGCTCCTT CTTCCTTACA GCAAGCTCACCG TGGACAAGA GCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCATG AGGCTCTGCACA ACCACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCTC CCGGGAAA (SEQ ID NO: 286)
PRD-1174	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWTL HAGRAHYRITYG ETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGL KPGVDYITVYAV TVTTTKVIHYKPI NYRTEIESPKAQA SSVPTAQPQAE LAKHTCPCPCAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 255)	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWTL PHAGRAHYRITY GETGGNSPVQEF TVPGRGVTATISG LKPGVDYITVYA VTVTTTKVIHYKPI SINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	ESPKAQASSVP TAQPQAEGLA (SEQ ID NO: 183)	KHTCPCPCAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCGA CGTGCCCCGGGA TCTAGAAGTGGT GGCTGCT ACCCCCACAAGC TTGCTGATC TCCTGGCACT GCCTACGCTG GCCGGGCTCAT TACTATAGAAT TACCTACGGGGA GACAGGC GGGAECTCTCC CGTGCAGGAATT CACCGTGCC TGGAAGGGGCG TGAAGCCAGGA GTGGACTACA CAATTACCGTG TACGCTGTGAC TGTGACCACAA CTAAAGTGATC CACTACAAACC CATCTCTATTAA TTATCGGACCGA AATTGAGTCTC

					CAAAGGCTCAG GCCAGCTCCG TGCCTACCGCT CAGCCACAGGCT GAGGGCCTG GCTAAGACCCA CACATGCCCC CTTGTCCAGCT CCCGAACTGCT GGCGGGCCT TCAGTCTTCTCT TCCCCCAAAC CCAAGGACACCC TCATGATCTCCC GACCCCTGA GGTCACATGCGT GGTGGTGGACG TGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGG TACGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGT ACAACAGC ACGTACCGTGT GGTCAGCGTC CTCACCGTC CTGCACCAGGAC TGGCTGAATG GCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTC TCCAACAAGCC CTCCAGCC CCCATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGGG CAGCCCCGA GAACCACAGGTG TACACCCTGCCC CCATCCGGGAT GAGCTGACCAAG AACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCT ATC CCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACA ACTACAAGACCA CGCCTC CCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAG
--	--	--	--	--	--

					CAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTG CACAACTACTACA CGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCC CGGGAAA (SEQ ID NO: 287)
PRD-1175	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGVSDV PRDLEVVAAATPTS LLISWTLPHAGRA HYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRG VTATISGLKPGVD YTITVYAVTVTTK VIHYKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 256)	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)	GAGGGGSG (SEQ ID NO: 181)	GVSDVPRDLEVAATP TLLISWTLPHAGRAHY YRITYGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATISGLK GVDYITVYAVTVTTK VIHYKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	GACAAAACCTCACA CATGCCACCGT GCCAGCACCTG AACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCT TCCTCTCCCCC AAAACCAAGGA CACCCATGATG TCCCGGACCCCT GAGGTACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCTG ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCA GCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCAG CCTCCCGTGTG

					<p>GACTCCGACGGC  TCCTTCTCCTCT  ACAGCAAGCTCA  CCGTGGACAAGA  GCAGGTGGCAGC  AGGGGAACGTCT  TCTCATGCTCCGT  GATGCATGAGGC  TCTGCACAACCA  CTACACGCAGAA  GAGCCTCTCCCT  GTCTCCCGGCGC  CGGAGGCGGCG  GATCCGGTGGCG  TGCCGACGTGC  CCCGGATCTAG  AAGTGGTGGCTG  CTACCCCAACA  GCTTGCTGATCTC  CTGGACACTGCC  TCACGCTGGCCG  GGCTCATTACTAT  AGAATTACCTACG  GGGAGACAGGCG  GGAACCTCTCCCG  TGCAGGAATCA  CCGTGCCTGGAA  GGGGCGTGACTG  CCACCATCAGTG  GGCTGAAGCCAG  GAGTGGACTACA  CAATTACCGTGTA  CGCTGTGACTGT  GACCACAATAAA  GTGATCCACTACA  AACCCATCTCTAT  TAATTATCGGACC  GAAATC (SEQ ID  NO: 288)</p>
PRD-1177	<p>DKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMISRTPE  VTCVVVDVSHED  PEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREE  QYNSTYRVVSVLT  VLHQDWLNGKEY  KCKVSNKALPAPI  EKTISKAKGQPRE  PQVYTLPPSRDEL  TKNQVSLTCLVKG  FYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTPP  VLDSFGSFFLYSK  LTVDKSRWQQGN</p>	<p>DKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMISRTPE  VTCVVVDVSHED  PEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREE  QYNSTYRVVSVLT  VLHQDWLNGKEY  KCKVSNKALPAPI  EKTISKAKGQPRE  PQVYTLPPSRDEL  TKNQVSLTCLVKG  FYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTPP  VLDSFGSFFLYSK  LTVDKSRWQQGN</p>	<p>ELQLEESAAEA  QDGELD (SEQ  ID NO: 184)</p>	<p>GVSDVPRDLEVAATP  TLLISWTLPHAGRAHY  YRITYGETGGNSPVQE  FTVPGRGVTATISGLKP  GVDYTITVYAVTVTTTK  VIHYKPISINYRTEI (SEQ  ID NO: 275)</p>	<p>GACAAAACCTCACA  CATGCCACCCTG  GCCAGCACCTG  AACTCCTGGGGG  GACCGTCAGTCT  TCCTCTCCCCC  AAAACCAAGGA  CACCCATGATGAT  TCCCGGACCCCT  GAGGTACATGC  GTGGTGGTGGAC  GTGAGCCACGAA  GACCCTGAGGTC  AAGTTCAACTGGT  ACGTGGACGGCG  TGGAGGTGCATA</p>

	VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP LQLEESAAEAQD GELDGVSDVPRD LEVVAATPTLLIS WTLPHAGRAHY RITYGETGGNSPV QEFTVPGRGVTA TISGLKPGVDYIT VYAVTVTTKVIH YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 257)	VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)			ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCTGCG ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCACG CCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGAGCT GCAGCTGGAGGA AAGCGCCGCTGA GGCTCAGGACGG AGAACTGGATGG CGTGAGCGACGT GCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGC TGCTACCCCCAC AAGCTTGCTGATC TCCTGGACACTG CCTCAGCTGGC CGGGCTCATTAC TATAGAATTACCT ACGGGAGACAG GCGGGAACCTC CCGTGCAGGAAT
--	--	--	--	--	---

					TCACCGTGCCTG GAAGGGGCGTGA CTGCCACCATCA GTGGGCTGAAGC CAGGAGTGGACT ACACAATTACCGT GTACGCTGTGAC TGTGACCACAAC AAAGTGATCCACT ACAAACCCATCTC TATTAATTATCGG ACCGAAATT (SEQ ID NO: 289)
PRD-1178	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPG QPDEPGGSGVSD VPRDLEVVAATPT SLLISWTLPHAGR AHYRITYGETGG NSPVQEFTVPGR GVTATISGLKPGV DYTITVYAVTVTT KVIHYKPISINYRT EI (SEQ ID NO: 258)	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)	GQPDEPGGS (SEQ ID NO: 185)	GVSDVPRDLEVVAATP TLLISWTLPHAGRAHY YRITYGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATISGLK GVDYITVYAVTVTTK VIHYKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	GACAAAACCTCACA CATGCCACCGT GCCAGCACCTG AACTCCTGGGG GACCGTCAGTCT TCCTCTCCCCC AAAACCAAGGA CACCTCATGATC TCCCGGACCCCT GAGGTCACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCTGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCA GCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCAG

					<p>CCTCCCGTGCTG  GACTCCGACGGC  TCCTTCTCCTCT  ACAGCAAGCTCA  CCGTGGACAAGA  GCAGGTGGCAGC  AGGGGAACGTCT  TCTCATGCTCCGT  GATGCATGAGGC  TCTGCACAACCA  CTACACGCAGAA  GAGCCTCTCCCT  GTCTCCCGGCCA  GCCCCACGAGCC  TGGCGGAGCGG  CGTGAGCGACGT  GCCACGGGATCT  AGAAAGTGGTGGC  TGCTACCCCCAC  AAGCTTGCTGATC  TCCTGGACACTG  CCTCACGCTGGC  CGGGCTCATTAC  TATAGAATTACCT  ACGGGGAGACAG  GCGGGAACCTCTC  CCGTGCAGGAAT  TCACCGTGCCTG  GAAGGGGCGTGA  CTGCCACCATCA  GTGGGCTGAAGC  CAGGAGTGGACT  ACACAATTACCGT  GTACGCTGTGAC  TGTGACCACAAC  AAAGTGATCCACT  ACAAACCCATCTC  TATTAATTATCGG  ACCGAAATT (SEQ  ID NO: 290)</p>
PRD-1180	<p>DKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMISRTPE  VTCVVVDVSHED  PEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREE  QYNSTYRVVSVLT  VLHQDWLNGKEY  KCKVSNKALPAPI  EKTISKAKGQPRE  PQVYTLPPSRDEL  TKNQVSLTCLVKG  FYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTPP  VLDSGDSFFLYSK</p>	<p>DKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMISRTPE  VTCVVVDVSHED  PEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREE  QYNSTYRVVSVLT  VLHQDWLNGKEY  KCKVSNKALPAPI  EKTISKAKGQPRE  PQVYTLPPSRDEL  TKNQVSLTCLVKG  FYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTPP  VLDSGDSFFLYSK</p>	<p>GGSGSGSGSG  SGS (SEQ ID  NO: 186)</p>	<p>GVSDVPRDLEVAATP  TLLISWTLPHAGRAHY  YRITYGETGGNSPVQE  FTVPGRGVTATISGLKP  GVDYITIVYAVTVTTK  VIHYKPISINYRTEI (SEQ  ID NO: 275)</p>	<p>GACAAAACCTCACA  CATGCCCACCGT  GCCAGCACCTG  AACTCCTGGGGG  GACCGTCAGTCT  TCCTCTCCCCCC  AAAACCCAAGGA  CACCCCTCATGATC  TCCCCGACCCCT  GAGGTACATGC  GTGGTGGTGGAC  GTGAGCCACGAA  GACCCTGAGGTC  AAGTTCAACTGGT  ACGTGGACGGCG</p>

	<p>           LTVDKSRWQQGN            VFSCSVMHEALH            NHYTQKSLSLSPG            GSGSGSGSGSGS            GVSDVPRDLEVV            AATPTSLISWTLPL            HAGRAHYRITYG            ETGGNSPVQEFT            VPGRGVTATISGL            KPGVDYITIVYAV            TVTTTKVIHYKPISI            NYRTEI (SEQ ID            NO: 259)         </p>	<p>           LTVDKSRWQQGN            VFSCSVMHEALH            NHYTQKSLSLSP            (SEQ ID NO: 276)         </p>			<p>           TGGAGGTGCATA            ATGCCAAGACAA            AGCCGCGGGAGG            AGCAGTACAACA            GCACGTACCGTG            TGGTCAGCGTCC            TCACCGTCTGTC            ACCAGGACTGGC            TGAATGGCAAGG            AGTACAAGTGCA            AGGTCTCCAACA            AAGCCCTCCCAG            CCCCCATCGAGA            AAACCATCTCAA            AGCCAAAGGGCA            GCCCCGAGAACC            ACAGGTGTACAC            CCTGCCCCCATC            CCGGGATGAGCT            GACCAAGAACCA            GGTGAGCCTGAC            CTGCCTGGTCAA            AGGCTTCTATCCC            AGCGACATCGCC            GTGGAGTGGGAG            AGCAATGGGAG            CCGGAGAACAAC            TACAAGACCACG            CCTCCCGTGCTG            GACTCCGACGGC            TCCTTCTTCTCT            ACAGCAAGCTCA            CCGTGGACAAGA            GCAGGTGGCAGC            AGGGGAACGTCT            TCTCATGCTCCGT            GATGCATGAGGC            TCTGCACAACCA            CTACACGCAGAA            GAGCCTCTCCCT            GTCTCCCGGCGG            CAGCGGTCTGG            ATCTGGCAGTGG            GAGCGGCTCTGG            CGTGAGCGACGT            GCCACGGGATCT            AGAAGTGGTGGC            TGCTACCCCCAC            AAGCTTGCTGATC            TCCTGGACACTG            CCTCACGCTGGC            CGGGCTCATTAC            TATAGAATTACCT            ACGGGGAGACAG            GCGGGAACCTC            CCGTGCAGGAAT         </p>
--	---	---	--	--	--

					TCACCGTGCCTG GAAGGGGCGTGA CTGCCACCATCA GTGGGCTGAAGC CAGGAGTGGACT ACACAATTACCGT GTACGCTGTGAC TGTGACCACAAC AAAGTGATCCACT ACAAACCCATCTC TATTAATTATCGG ACCGAAATT (SEQ ID NO: 291)
PRD-1284	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP LQLEESAAEAQD GELDGVSDVPRD LEVVAATPTLLIS WDAPRGLARYR ITYGETGGNSPVQ EFTVFRGTTATI SGLKPGVDYITV YAVTIDRDGTRSF DPISINYRTEI (SEQ ID NO: 260)	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAAEA QDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEVVAATP TLLISWDAPRGLARYY RITYGETGGNSPVQEF TVFGRGTTATISGLKPG VDYITVYAVTIDRDGT RSFDPISINYRTEI (SEQ ID NO: 277)	GACAAAACCTCACA CATGCCACCGT GCCCAGCACCTG AACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCT TCCTCTCCCCC AAAACCAAGGA CACCTCATGATC TCCCGGACCCCT GAGGTCACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCCGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCCCTGC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCAAACA AAGCCCTCCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCA GCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGAG CCGGAGAACAAC

					<p>TACAAGACCACG                  CCTCCCGTGCTG                  GACTCCGACGGC                  TCCTTCTCCTCT                  ACAGCAAGCTCA                  CCGTGGACAAGA                  GCAGGTGGCAGC                  AGGGGAACGTCT                  TCTCATGCTCCGT                  GATGCATGAGGC                  TCTGCACAACCA                  CTACACGCAGAA                  GAGCCTCTCCCT                  GTCTCCCGAGCT                  GCAGCTGGAGGA                  AAGCGCCGCTGA                  GGCTCAGGACGG                  AGAACTGGATGG                  CGTGAGCGACGT                  GCCACGGGATCT                  AGAAGTGGTGGC                  TGCTACCCCCAC                  AAGCTTGCTGATC                  AGCTGGGACGCT                  CCGAGAGGTCTG                  GCTCGATATTACC                  GCATCACTTACG                  GCGAAACAGGAG                  GCAATAGCCCTG                  TCCAGGAGTTCA                  CTGTGTTCCGGTC                  GTGGTACCACAG                  CTACCATCAGCG                  GCCTTAAACCTG                  GCGTTGATTATAC                  CATCACTGTGTAT                  GCTGTCACTATC                  GACCGTGACGGT                  ACCCGCAGCTTC                  GACCCAATTTCCA                  TTAATTACCGGAC                  CGAAATT (SEQ ID                  NO: 292)</p>
PRD-1285	<p>DKTHTCPPCPAP                  ELLGGPSVFLFPP                  KPKDTLMISRTPE                  VTCVVDVSHED                  PEVKFNWYVDGV                  EVHNAKTKPREE                  QYNSTYRVVSVLT                  VLHQDWLNGKEY                  KCKVSNKALPAPI                  EKTISKAKGQPRE                  PQVYTLPPSRDEL                  TKNQVSLTCLVKG                  FYPSDIAVEWESN</p>	<p>DKTHTCPPCPAP                  ELLGGPSVFLFPP                  KPKDTLMISRTPE                  VTCVVDVSHED                  PEVKFNWYVDGV                  EVHNAKTKPREE                  QYNSTYRVVSVLT                  VLHQDWLNGKEY                  KCKVSNKALPAPI                  EKTISKAKGQPRE                  PQVYTLPPSRDEL                  TKNQVSLTCLVKG                  FYPSDIAVEWESN</p>	<p>ELQLEESAAEA                  QDGELD (SEQ                  ID NO: 184)</p>	<p>GVSDVPRDLEVAATP                  TSLISWDAPAGLARYY                  RITYGETGGNSPVQEF                  TVVGRGNTATISGLKPG                  VDYTITVYAVTIFRDGP                  VTWDPISINYRTEI (SEQ                  ID NO: 278)</p>	<p>GACAAAACACTACA                  CATGCCACCGT                  GCCCAGCACCTG                  AACTCCTGGGGG                  GACCGTCAGTCT                  TCCTCTTCCCCC                  AAAACCCAAGGA                  CACCCTCATGATC                  TCCCGGACCCCT                  GAGGTCACATGC                  GTGGTGGTGGAC                  GTGAGCCACGAA                  GACCCCTGAGGTC</p>

<p>GQPENNYKTPP  VLDSDGSFFLYSK  LTVDKSRWQQGN  VFSCSVMHEALH  NHYTQKSLSLSP  LQLEESAAEAQD  GELDGVSDVPRD  LEVVAATPTLLIS  WDAPAGLARYYRI  TYGETGGNSPVQ  EFTVVGRGNTATI  SGLKPGVDYITV  YAVTIFRDGPVTW  DPISINYRTEI  (SEQ ID NO: 261)</p>	<p>GQPENNYKTPP  VLDSDGSFFLYSK  LTVDKSRWQQGN  VFSCSVMHEALH  NHYTQKSLSLSP  (SEQ ID NO: 276)</p>			<p>AAGTTCAACTGGT  ACGTGGACGGCG  TGGAGGTGCATA  ATGCCAAGACAA  AGCCGCGGGAGG  AGCAGTACAACA  GCACGTACCGTG  TGGTCAGCGTCC  TCACCGTCTGCG  ACCAGGACTGGC  TGAATGGCAAGG  AGTACAAGTGCA  AGGTCTCCAACA  AAGCCCTCCCAG  CCCCCATCGAGA  AAACCATCTCCAA  AGCCAAAGGGCA  GCCCCGAGAACC  ACAGGTGTACAC  CCTGCCCCCATC  CCGGGATGAGCT  GACCAAGAACCA  GGTCAGCCTGAC  CTGCCTGGTCAA  AGGTTCTATCCC  AGCGACATCGCC  GTGGAGTGGGAG  AGCAATGGGCAG  CCGGAGAACAAC  TACAAGACCACG  CCTCCCGTGCTG  GACTCCGACGGC  TCCTTCTCCTCT  ACAGCAAGCTCA  CCGTGGACAAGA  GCAGGTGGCAGC  AGGGGAACGTCT  TCTCATGCTCCGT  GATGCATGAGGC  TCTGCACAACCA  CTACACGCAGAA  GAGCCTCTCCCT  GTCTCCCGAGCT  GCAGCTGGAGGA  AAGCGCCGCTGA  GGCTCAGGACGG  AGAACTGGATGG  CGTGAGCGACGT  GCCACGGGATCT  AGAAGTGGTGGC  TGCTACCCCCAC  AAGCTTGCTGATC  AGCTGGGACGCT  CCGGCTGGTCTG  GCTCGATATTACC  GCATCACTTACG</p>
--	---	--	--	--

					GCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTG TCCAGGAGTTCA CTGTGGTCGGTC GTGGTAACACAG CTACCATCAGCG GCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAC CATCACTGTGTAT GCTGTCACATCT TCCGTGACGGTC CCGTACCTGGG ACCCAATTTCCAT TAATTACCGGACC GAAATT (SEQ ID NO: 293)
PRD-1286	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP LQLEESAAEAQD GELDGVSDVPRD LEVVAATPTSLLIS WDAPKGLARYYRI TYGETGGNSPVQ EFTVVGGRNTATI SGLKPGVDYITIV YAVTIFRDGPVTW DPISINYRTEI (SEQ ID NO: 262)	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAAEA QDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEVVAATP TSLISWDAPKGLARYY RITYGETGGNSPVQEF TVVGRGNTATISGLKPG VDYITIVYAVTIFRDGP VTWDPISINYRTEI (SEQ ID NO: 279)	GACAAAACACTCACA CATGCCACCCGT GCCCAGCACCTG AACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCC AAAACCAAGGA CACCCCTCATGATC TCCCGGACCCCT GAGGTACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCCGTGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCTGTC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC

					GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCACG CCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGC TCCTTCTCCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGAGCT GCAGCTGGAGGA AAGCGCCGCTGA GGCTCAGGACGG AGAACTGGATGG CGTGAGCGACGT GCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGC TGCTACCCCCAC AAGCTTGCTGATC AGCTGGGACGCT CCGAAGGGTCTG GCTCGATATTACC GCATCACTTACG GCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTG TCCAGGAGTTCA CTGTGGTCGGTC GTGGTAACACAG CTACCATCAGCG GCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAC CATCACTGTGAT GCTGTCACTATCT TCCGTGACGGTC CCGTCACCTGGG ACCCAATTTCCAT TAATTACCGGACC GAAATT (SEQ ID NO: 294)
PRD-1287	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI	ELQLEESAAEA QDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEVVAATP TLLISWSLPNSGNAHY YRITYGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATISGLKP GVDYITIVYAVTVTDG FITYKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 280)	GACAAAACACTCACA CATGCCACCCTG GCCAGCACCTG AACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGA CACCCCTCATGATC TCCCGGACCCCT

	EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP LQLEESAAEAQD GELDGVSDVPRD LEVVAATPTLLIS WSPNPGNAHYY RITYGETGGNSPV QEFTVPGRGVTA TISGLKPGVDYIT VYAVTVDTGFI YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 263)	EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)		GAGGTCACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCTGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCTGTC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCA GCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCAG CCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGAGCT GCAGCTGGAGGA AAGCGCCGCTGA GGCTCAGGACGG AGAACTGGATGG CGTGAGCGACGT GCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGC TGCTACCCCCAC AAGCTTGCTGATC
--	---	--	--	---

					AGCTGGTCTCTG CCGAATCCGGGT AACGCCATTATT ACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCC TGCCAGGAGTT CACTGTGCCTGG TCGTGGTGTAC GCTACCATCAGC GGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATA CCATCACTGTGTA TGCTGTCACTGTT ACTGACACAGGT TTCATCAGGTACA AACCAATTTCCAT TAATTACCGGACC GAAATT (SEQ ID NO: 295)
PRD-1288	DKTHTCPPCPAP ELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPP VLDSFGSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP LQLEESAAEAQD GELDGVSDVPRD LEVVAATPTSLIS WSLPHQGKANY RITYGETGGNSPV QEFTVPRGVTA TISGLKPGVDYIT VYAVTVDGTGYLK YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 264)	DKTHTCPPCPAP ELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPP VLDSFGSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAAEA QDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEVAATP TSLISWSLPHQGKANY YRITYGETGGNSPVQE FTVPGRGVATISGLKP GVDYITVYAVTVDGTG YLKYPISINYRTEI (SEQ ID NO: 281)	GACAAAACCTCACA CATGCCACCCTG GCCAGCACCTG AACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCT TCCTCTCCCCC AAAACCAAGGA CACCCATGATG TCCCGGACCCT GAGGTCACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCCGTGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCCTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA

					GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCAG CCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGAGCT GCAGCTGGAGGA AAGCGCCGCTGA GGCTCAGGACGG AGAACTGGATGG CGTGAGCGACGT GCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGC TGCTACCCCCAC AAGCTTGCTGATC AGCTGGTCTCTG CCGCACCAAGGT AAAGCCAATTATT ACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCC TGCCAGGAGTT CACTGTGCCTGG TCGTGGTGTTACA GCTACCATCAGC GGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATA CCATCACTGTGTA TGCTGTCACTGTT ACTGATACAGGG TACCTCAAGTACA AACCAATTTCCAT TAATTACCGGACC GAAATT (SEQ ID NO: 296)
PRD-1301	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWDA PRGLARYRITYG ETGGNSPVQEFT VFGRGTTATISGL	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWDA PRGLARYRITYG ETGGNSPVQEFT VFGRGTTATISGL	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRV	GGCGTGAGCGAC GTGCCCGGGAT CTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTG

	KPGVDYITVYAV TIDRDGTRSFDP SINYRTEIEPKSSD KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKC KVSNNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 265)	KPGVDYITVYAV TIDRDGTRSFDP SINYRTEI (SEQ ID NO: 277)		VSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	ATCAGCTGGGAC GCTCCGAGAGGT CTGGCTCGATATT ACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCC TGTCAGGAGTT CACTGTGTTCGG TCGTGGTACCAC AGCTACCATCAG CGGCCTTAAACC TGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGT ATGCTGTCACTAT CGACCGTGACGG TACCCGCAGCTT CGACCCAATTTCC ATTAATTACCGGA CCGAAATTGAGC CTAAGAGCTCCG ACAAAACCCACA CATGCCACCTT GTCCAGCCCCCG AACTGCTGGGCG GCCCTTCAGTCTT CCTCTTCCCCC AAAACCAAGGA CACCTCATGATC TCCCGACCCCT GAGGTCACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC
--	--	--	--	---	--

					CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCACG CCTCCCGTGTG GACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGGGAA A (SEQ ID NO: 297)
PRD-1302	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWDA PAGLARYRITYG ETGGNSPVQEFT VVGrgNTATISGL KPGVDYITVYAV TIFRDGPVTDPI SINYRTEIEPKSSD KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEK TISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 266)	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWDA PAGLARYRITYG ETGGNSPVQEFT VVGrgNTATISGL KPGVDYITVYAV TIFRDGPVTDPI SINYRTEI (SEQ ID NO: 278)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALH NHYTKQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCGAC GTGCCCGGGGAT CTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTG ATCAGCTGGGAC GCTCCGGCTGGT CTGGCTCGATATT ACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCC TGCCAGGAGTT CACTGTGGTCCG TCGTGGTAACAC AGCTACCATCAG CGGCCTTAAACC TGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGT ATGCTGTCATAT CTTCCGTGACGG TCCCGTCACTG GGACCCAATTC CATTAAATTACCGG ACCGAAATTGAG CCTAAGAGCTCC GACAAAACCCAC ACATGCCACCTT GTCCAGCCCCCG AACTGCTGGGCG GCCCTTCAGTCTT CCTCTCCCCC AAAACCAAGGA CACCTCATGATC TCCCGGACCCCT

					GAGGTCACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTC AAGTTCACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCA GCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCAG CCTCCGTGTTG GACTCCGACGGC TCCTTCTCCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGGGAA A (SEQ ID NO: 298)
PRD-1303	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWDA PKGLARYRITYG ETGGNSPVQEFT VVGrgNTATISGL KPGVDYITVYAV TIFRDGPVTDPI	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWDA PKGLARYRITYG ETGGNSPVQEFT VVGrgNTATISGL KPGVDYITVYAV TIFRDGPVTDPI	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPEPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI	GGCGTGAGCGAC GTGCCCGGGAT CTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTG ATCAGCTGGGAC GCTCCGAAGGTT

	SINYRTEIEPKSSD KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNNH YTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 267)	SINYRTEI (SEQ ID NO: 279)		SKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSVMHEALH NHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	CTGGCTCGATATT ACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCC TGCCAGGAGTT CACTGTGGTCGG TCGTGGTAACAC AGCTACCATCAG CGGCCTTAAACC TGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGT ATGCTGTCACTAT CTCCGTGACGG TCCCGTCACCTG GGACCAATTC CATTAAATTACCGG ACCGAAATTGAG CCTAAGAGCTCC GACAAAACCCAC ACATGCCACCTT GTCCAGCCCCCG AACTGCTGGGCG GCCCTTCAGTCTT CCTCTTCCCCC AAAACCAAGGA CACCCCTATGATC TCCCGACCCCT GAGGTCACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCTGTC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC
--	--	------------------------------	--	--	---

					AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCACG CCTCCCGTGTG GACTCCGACGGC TCCTTCTCCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGGAA A (SEQ ID NO: 299)
PRD-1304	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWLS PNPGNAHYRITY GETGGNSPVQEF TVPGRGVATISG LKPGVDYITVYA VTVDTGFITYKPI SINYRTEIEPKSSD KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKC KVS NKALPAIEK TISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 268)	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWLS PNPGNAHYRITY GETGGNSPVQEF TVPGRGVATISG LKPGVDYITVYA VTVDTGFITYKPI SINYRTEI (SEQ ID NO: 280)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAIEKTI SKAKGQPREPVYTL PSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCGAC GTGCCCGGGGAT CTAGAAGTGGTG GCTGTACCCCC ACAAGCTTGCTG ATCAGCTGGTCT CTGCCAATCCG GGTAACGCCCAT TATTACGCATCA CTTACGGCGAAA CAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGG AGTTCACTGTGC CTGGTCGTGGTG TTACAGTACCAT CAGCGCCTTAA ACCTGGCGTTGA TTATACCATCACT GTGTATGCTGTCA CTGTTACTGACAC AGGTTTCATCACG TACAAACCAATTT CCATTAATTACCG GACCGAAATTGA GCCTAAGAGCTC CGACAAAACCCA CACATGCCACC TTGTCCAGCCCC CGAACTGCTGGG CGGCCCTTCAGT CTTCTCTTCCCC CCAAAACCAAG GACACCCTCATG ATCTCCCGGACC CCTGAGGTACACA TGCCTGGTGGTG

					GACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAA CAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCT GCACCAGGACTG GCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCC AGCCCCATCGA GAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCA TCCCGGATGAG CTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACA ACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGT TGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCT CTACAGCAAGCT CACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAG GCTCTGCACAAC CACTACACGCAG AAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGGG AAA (SEQ ID NO: 300)
PRD-1305	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWSL PHQGKANYRITY GETGGNSPVQEF TVPGRGVATISG LKPGVDYITVYA VTVDTGYLKYP ISINYRTEIEPKSS	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWSL PHQGKANYRITY GETGGNSPVQEF TVPGRGVATISG LKPGVDYITVYA VTVDTGYLKYP ISINYRTEI (SEQ	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPEPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDNLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLF	GGCGTGAGCGAC GTGCCCGGGAT CTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTG ATCAGCTGGTCT CTGCCGCACCAA GGTAAAGCCAATT

	DKTHTCPPCPAP ELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 269)	ID NO: 281)		PSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	ATTACCGCATCAC TTACGGCGAAAC AGGAGGCAATAG CCCTGTCCAGGA GTTCACTGTGCCT GGTCGTGGTGTT ACAGCTACCATCA GCGGCCTTAAC CTGGCGTTGATTA TACCATCACTGTG TATGCTGTCACTG TACTGATACAGG GTACCTCAAGTAC AAACCAATTTCCA TTAATTACCGGAC CGAAATTGAGCC TAAGAGCTCCGA CAAACCCACAC ATGCCACCTTGT CCAGCCCCGAA CTGCTGGGCGGC CCTTCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAG GTCACATGCGTG GTGGTGGACGTG AGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGG AGGTGCATAATG CCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCA CGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCA CCGTCTGCACC AGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGC CCTCCAGCCCC CATCGAGAAAAC CATCTCAAAGC CAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACA GGTGTACACCCT GCCCCATCCCG GGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGG CTTCTATCCAGC GACATCGCCGTG
--	---	-------------	--	---	--

					GAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCG GAGAACAACACTAC AAGACCACGCCT CCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCC TTCTTCTCTACA GCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTC TGCACAACCTACTA CACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCT CCCGGAAA (SEQ ID NO: 301)
PRD-1471	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP LQLEESAAEAQE GELEGVSDVPRD LEVVAATPTSLNIS WTLPHAGRAHY RITYGETGGNSPV QEFTVPGRGVTA TISGLKPGVDYIT VYAVTVTTTKVIH YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 270)	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAAEA QEGELE (SEQ ID NO: 187)	GVSDVPRDLEVVAATP TSLNISWTLPHAGRAHY YRITYGETGGNSPVQE FTVPGRGVATISGLKP GVDYITVYAVTVTTTK VIHYKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	GACAAAACCTCACA CATGCCACCCGT GCCAGCACCTG AACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCT TCCTCTCCCCCC AAAACCCAAGGA CACCCCTCATGATC TCCCGGACCCCT GAGGTCACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCCGGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA

					AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCACG CCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGAGCT GCAGCTGGAGGA AAGCGCCGCTGA GGCTCAGGAAGG AGAACTGGAAGG CGTGAGCGACGT GCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGC TGCTACCCCCAC AAGCTTGCTGATC TCCTGGACACTG CCTCACGCTGGC CGGGCTCATTAC TATAGAATTACCT ACGGGGAGACAG GCGGGAACTCTC CCGTGCAGGAAT TCACCGTGCCTG GAAGGGGCGTGA CTGCCACCATCA GTGGGCTGAAGC CAGGAGTGGACT ACACAATTACCGT GTACGCTGTGAC TGTGACCACAAC AAAGTGATCCACT ACAAACCCATCTC TATTAATTATCGG ACCGAAATT (SEQ ID NO: 302)
PRD-1472	DKTHTCPPCPAP ELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT	DKTHTCPPCPAP ELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT	ELQLEESAAEA QEGELE (SEQ ID NO: 187)	GVSDVPRDLEVAATP TLLISWDAPAGLARYY RITYGETGGNSPVQEF TVVGRGNTATISGLKPG VDYTITVYAVTIFRDGP VTWDPISINYRTEI (SEQ ID NO: 278)	GACAAAACCTCACA CATGCCACCCTG GCCACGACCTG AACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCT TCCTCTCCCCC AAAACCAAGGA

<p>VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDGFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLPE LQLEESAAEAQE GELEGVSDVPRD LEVVAATPTSLIS WDAPAGLARYYRI TYGETGGNSPVQ EFTVVGRGNTATI SGLKPGVDYITV YAVTIFRDGPVTW DPISINYRTEI (SEQ ID NO: 271)</p>	<p>VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDGFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLP (SEQ ID NO: 276)</p>			<p>CACCCTCATGATC TCCCGGACCCCT GAGGTCACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCTGTC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCACG CCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGAGCT GCAGCTGGAGGA AAGCGCCGCTGA GGCTCAGGAAGG AGAAGTGGAAAGG CGTGAGCGACGT GCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGC</p>
--	---	--	--	---

					<p>TGCTACCCCCAC  AAGCTTGCTGATC  AGCTGGGACGCT  CCGGCTGGTCTG  GCTCGATATTACC  GCATCACTTACG  GCGAAACAGGAG  GCAATAGCCCTG  TCCAGGAGTTCA  CTGTGGTCGGTC  GTGGTAACACAG  CTACCATCAGCG  GCCTTAAACCTG  GCGTTGATTATAC  CATCACTGTGTAT  GCTGCACTATCT  TCCGTGACGGTC  CCGTACCTGGG  ACCCAATTTCCAT  TAATTACCGGACC  GAAATT (SEQ ID  NO: 303)</p>
PRD-1473	<p>DKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMISRTPE  VTCVVVDVSHED  PEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREE  QYNSTYRVVSVLT  VLHQDWLNGKEY  KCKVSNKALPAPI  EKTISKAKGQPRE  PQVYTLPPSRDEL  TKNQVSLTCLVKG  FYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTPP  VLDSGDGFLLYSK  LTVDKSRWQQGN  VFSCVMHEALH  NHYTQKSLSLSPE  LQLEESAAEAQE  GELEGVSDVPRD  LEVVAATPTSLIS  WDAPKGLARYYRI  TYGETGGNSPVQ  EFTVVGRGNTATI  SGLKPGVDYITV  YAVTIFRDGPVTW  DPISINYRTEI  (SEQ ID NO: 272)</p>	<p>DKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMISRTPE  VTCVVVDVSHED  PEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREE  QYNSTYRVVSVLT  VLHQDWLNGKEY  KCKVSNKALPAPI  EKTISKAKGQPRE  PQVYTLPPSRDEL  TKNQVSLTCLVKG  FYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTPP  VLDSGDGFLLYSK  LTVDKSRWQQGN  VFSCVMHEALH  NHYTQKSLSLSP  (SEQ ID NO: 276)</p>	<p>ELQLEESAAEA  QEGELE (SEQ  ID NO: 187)</p>	<p>GVSDVPRDLEVAATP  TLLISWDAPKGLARYY  RITYGETGGNSPVQEF  TVVGRGNTATISGLKPG  VDYITVYAVTIFRDGP  VTWDPISINYRTEI (SEQ  ID NO: 279)</p>	<p>GACAAAACACACA  CATGCCACCCTG  GCCAGCACCTG  AACTCCTGGGGG  GACCGTCAGTCT  TCCTCTCCCCC  AAAACCAAGGA  CACCCCTCATGATC  TCCCGGACCCCT  GAGGTCACATGC  GTGGTGGTGGAC  GTGAGCCACGAA  GACCCCTGAGGTC  AAGTTCAACTGGT  ACGTGGACGGCG  TGGAGGTGCATA  ATGCCAAGACAA  AGCCGCGGGAGG  AGCAGTACAACA  GCACGTACCGTG  TGGTCAGCGTCC  TCACCGTCTGTC  ACCAGGACTGGC  TGAATGGCAAGG  AGTACAAGTGCA  AGGTCTCCAACA  AAGCCCTCCCAG  CCCCATCGAGA  AAACCATCTCCAA  AGCCAAAGGGCA  GCCCCGAGAACC  ACAGGTGTACAC  CCTGCCCCCATC</p>

					CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTGAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCACG CCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGC TCCTTCTCCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGAGCT GCAGCTGGAGGA AAGCGCCGCTGA GGCTCAGGAAGG AGAACTGGAAGG CGTGAGCGACGT GCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGC TGCTACCCCCAC AAGCTTGCTGATC AGCTGGGACGCT CCGAAGGGTCTG GCTCGATATTACC GCATCACTTACG GCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTG TCCAGGAGTTCA CTGTGGTCGGTC GTGGTAACACAG CTACCATCAGCG GCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAC CATCACTGTGAT GCTGTCACTATCT TCCGTGACGGTC CCGTACCTGGG ACCCAATTTCCAT TAATTACCGGACC GAAATT (SEQ ID NO: 304)
PRD-1474	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE	ELQLEESAAEA QEGELE (SEQ ID NO: 187)	GVSDVPRDLEVVAATP TSLISWSLPHQGKANY YRITYGETGGNSPVQE	GACAAAACCTCACA CATGCCACCGT GCCAGCACCTG

VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP LQLEESAAEAQE GELEGVSDVPRD LEVVAATPTSLIS WSPHQGKANY RITYGETGGNSPV QEFTVPGRGVTA TISGLKPGVDYIT VYAVTVDGTGYLK YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 273)	VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTPREE QYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)		FTVPGRGVATISGLKP GVDYITVYAVTVDGTG YLKYKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 281)	AACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCC AAAACCAAGGA CACCTCATGATC TCCCGGACCCCT GAGGTCACATGC GTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAA GACCGTGAGGTC AAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACA GCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAG CCCCATCGAGA AAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACC ACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCT GACCAAGAACCA GGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAG CCGGAGAACAAC TACAAGACCACG CCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGC TCCTTCTCCTCT ACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGC TCTGCACAACCA CTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCT GTCTCCCGAGCT GCAGCTGGAGGA AAGCGCCGCTGA GGCTCAGGAAGG
--	--	--	---	---

					AGAACTGGAAGG CGTGAGCGACGT GCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGC TGCTACCCCCAC AAGCTTGCTGATC AGCTGGTCTCTG CCGCACCAAGGT AAAGCCAATTATT ACCGCATCACTTA CGGCGAACAGG AGGCAATAGCCC TGCCAGGAGTT CACTGTGCCTGG TCGTGGTGTACA GCTACCATCAGC GGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATA CCATCACTGTGTA TGCTGTCACTGTT ACTGATACAGGG TACCTCAAGTACA AACCAATTTCCAT TAATTACCGGACC GAAATT (SEQ ID NO: 305)
--	--	--	--	--	---

[00225] [208]As SEQ ID NOs de líder exemplar (N-terminal extension) e C-terminal tail SEQUÊNCIAS da invenção são apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7**

Sumário de Sequências Exemplares			
SEQ ID NO	Descrição	Nome	SEQUÊNCIA
306	Líder exemplar	AdNT1	MGVSDVPRDL
307	Líder exemplar	AdNT2	GVSDVPRDL
308	Líder exemplar	AdNT3	VSDVPRDL
309	Líder exemplar	AdNT4	SDVPRDL
310	Líder exemplar	AdNT5	DVPRDL
311	Líder exemplar	AdNT6	VPRDL
312	Líder exemplar	AdNT7	PRDL
---	Líder exemplar	AdNT8	RDL
---	Líder exemplar	AdNT9	DL
211	Cauda exemplar	AdCT1	EIDKPSQ
---	Cauda exemplar	AdCT2	EI
313	Cauda exemplar	AdCT3	EIEPKSS
314	Cauda exemplar	AdCT4	EIDKPC

315	Cauda exemplar	AdCT5	EIDKP
316	Cauda exemplar	AdCT6	EIDK
317	Cauda exemplar	AdCT7	EIDKPS
318	Cauda exemplar	AdCT8	EIEKPSQ
319	Cauda exemplar	AdCT9	EIDKPSQLE
320	Cauda exemplar	AdCT10	EIEDEDEDEDED
321	Cauda exemplar	AdCT11	EGSGS
322	Cauda exemplar	AdCT12	EIDKPCQ
189	Cauda exemplar	AdCT13	GSGC
323	Cauda exemplar	AdCT14	EGSGC
324	Cauda exemplar	AdCT15	EIDKPCQLE
325	Cauda exemplar	AdCT16	EIDKPSQHSHHHHH
326	Cauda exemplar	AdCT17	GSGCHSHHHHH
327	Cauda exemplar	AdCT18	EGSGCHSHHHHH
328	Tag	T1	HHSHHH

#### **IV. Tecnologia de Fusão de Ácido Nucleico-Proteína**

[00226] Em um aspecto, a invenção proporciona uma Adnectina compreendendo domínios de fibronectina de tipo III, que se ligam à miostatina. Uma maneira de rapidamente preparar e testar domínios fn3 com propriedades de ligação específicas é a tecnologia de fusão de ácido nucleico-proteína Adnexus, Bristol-Myers Squibb R&D Company. Esta divulgação utiliza a expressão in vitro e tecnologia de colocação de etiquetas, designada 'profusão' que explora as fusões de proteína-ácido nucleico (fusões de RNA- e DNA-proteína) para identificar novos polipeptídeos e motivos de aminoácidos que são importantes para a ligação às proteínas. A tecnologia de fusão do ácido nucleico-proteína é uma tecnologia que covalentemente acopla uma proteína a sua informação genética de codificação. Para uma descrição detalhada da tecnologia de fusão RNA-proteína e métodos de triagem de bibliotecas de proteína arcabouço com base em fibronectina vide Szostak et al., U.S. Pat. Nos. 6,258,558, 6,261,804, 6,214,553, 6,281,344, 6,207,446, 6,518,018 e 6,818,418; Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997;94:12297-12302; e Kurz et al., *Molecules*, 2000;5:1259-64, todos os quais são aqui incorporados por referência.

#### **V. Vetores e Polinucleotídeos**

[00227] Os ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das diversas proteínas ou polipeptídeos aqui descritos podem ser sintetizados quimicamente. Utilização de códons pode ser selecionada de modo a melhorar a expressão em uma célula. Tal utilização do códon dependerá do tipo de célula selecionada. Padrões de utilização de códons especializados foram desenvolvidos para *E. coli* e outras bactérias, bem como células de mamífero, células vegetais, células de levedura e células de inseto. Vide, por exemplo: Mayfield et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(2):438-442 (Jan. 21, 2003); Sinclair et al., *Protein Expr. Purif.*, 26(1):96-105 (Outubro, 2002); Connell, N.D., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12(5):446-449 (Outubro, 2001); Makrides et al., *Microbiol. Rev.*, 60(3):512-538 (Setembro, 1996); e Sharp et al., *Yeast*, 7(7):657-678 (Outubro, 1991).

[00228] As técnicas gerais para a manipulação de ácido nucleico são descritas em, por exemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), ou Ausubel, F. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing e Wiley-Interscience, New York (1987) e atualizações periódicas, aqui incorporadas por referência. Geralmente, o DNA que codifica o polipeptídeo está operacionalmente ligado à transcrição adequada ou elementos reguladores translacionais derivados de genes de mamífero, virais ou de insetos. Tais elementos reguladores incluem um promotor da transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar a transcrição, um sítio de ligação ribossomal de mRNA adequado que codifica sequência, e sequências que controlam a terminação da transcrição e da tradução. A capacidade para replicar em um hospedeiro, normalmente conferida por uma origem de replicação, e um gene de seleção para facilitar o reconhecimento de transformantes é adicionalmente incorporada.

[00229] As proteínas aqui descritas podem ser produzidas de forma

recombinante não só diretamente, mas também como um polipeptídeo de fusão com um polipeptídeo heterólogo, que é preferivelmente uma sequência de sinal ou outro polipeptídeo possuindo um sítio de clivagem específico no N-terminal da proteína madura ou polipeptídeo. A sequência de sinal heteróloga preferivelmente selecionada é uma que é reconhecida e processada (isto é, clivada por uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Uma sequência líder N-terminal exemplar para a produção de polipeptídeos em um sistema de mamífero é:

[00230] METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 177), que é removida pela célula hospedeira de expressão seguinte.

[00231] Para células hospedeiras procariotas que não reconhecem e processam a sequência de sinal nativa, a sequência sinal é substituída por uma sequência de sinal procariótica selecionada, por exemplo, a partir do grupo da fosfatase alcalina, penicilinase, 1 pp, líderes de ou enterotoxina II estável ao calor.

[00232] Para a secreção em levedura a sequência de sinal nativa pode ser substituída por, por exemplo, uma líder da invertase de levedura, uma líder de fator (incluindo líderes de fator alfa de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*), ou líder de fosfatase ácida, líder da glucoamilase de *C. albicans*, ou a sequência de sinal descrita na Pat. No. 5631144. Na expressão em células de mamífero, as sequências de sinal de mamífero bem como líderes de secreção viral, por exemplo, o sinal gD de herpes simplex, estão disponíveis. O DNA para estas regiões precursoras pode ser ligado em quadro de leitura ao DNA que codifica a proteína.

[00233] Ambos os vetores de expressão e de clonagem contêm uma sequência de ácido nucleico que permite ao vetor replicar em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Geralmente, em vetores de clonagem, esta sequência é uma que permite ao vetor replicar independentemente do DNA cromossômico do hospedeiro, e inclui

origens de replicação ou sequências de replicação autônoma. Tais sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo 2 micron é adequada para leveduras, e várias origens virais (SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vetores de clonagem em células de mamífero. Geralmente, a origem do componente de replicação não é necessária para vetores de expressão de mamífero (a origem de SV40 pode ser tipicamente utilizada apenas porque contém o promotor precoce).

[00234] Os vetores de expressão e clonagem podem conter um gene de seleção, também denominado um marcador selecionável. Os genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, ou traciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos, por exemplo, o gene que codifica D-alanina racemase para Bacilli.

[00235] Os vetores de expressão e clonagem contêm normalmente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operativamente ligado ao ácido nucleico que codifica a proteína da invenção, por exemplo, uma proteína arcabouço à base de fibronectina. Promotores adequados para utilização com hospedeiros procarióticos incluem os sistemas promotores de phoA, beta-lactamase e lactose, promotor de fosfatase alcalina, um sistema promotor do triptofano (trp), e promotores híbridos tais como o promotor de bronzeado. No entanto, outros promotores bacterianos conhecidos são adequados. Os promotores para utilização em sistemas bacterianos também irão conter uma sequência de Shine-DalgRNAo (SD) operativamente ligada ao DNA que codifica a proteína da invenção. São conhecidas sequências

promotoras para eucariotas. Virtualmente todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do local onde a transcrição é iniciada. Outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT onde N pode ser qualquer nucleotídeo. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos está uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para a adição da cauda poli A à extremidade 3' da sequência de codificação. Todas estas sequências são adequadamente inseridas em vetores de expressão eucarióticos.

[00236] Exemplos de sequências promotoras adequadas para utilização com hospedeiros de levedura incluem os promotores para 3-fosfoglicerato quinase ou outras enzimas glicolíticas, tais como enolase, desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato, hexocinase, piruvato descarboxilase, fosfofrutocinase, isomerase de glicose-6-fosfato, 3-fosfoglicerato-mutase, piruvato-quinase, triosefosfato-isomerase, fosfoglicose-isomerase e glucoquinase.

[00237] A transcrição a partir de vetores em células hospedeiras de mamífero pode ser controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tais como o vírus de polioma, poxvírus de aves, adenovírus (tais como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus de sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e mais preferivelmente Vírus Símio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por exemplo, o promotor da actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que estes promotores sejam compatíveis com os sistemas da célula hospedeira.

[00238] A transcrição de um DNA que codifica a proteína da invenção por eucariotas superiores é muitas vezes aumentada inserindo uma sequência potenciadora no vetor. Muitas sequências potenciadoras são agora conhecidas de genes de mamífero (globina, elastase, albumina,

a-fetoproteína e insulina). Tipicamente, contudo, alguém irá utilizar-se de um potenciador de um vírus de células eucarióticas. Exemplos incluem o potenciador de SV40 no lado precoce da origem de replicação (pb 100-270), o potenciador do promotor precoce de citomegalovírus, o potenciador de polioma no lado precoce da origem de replicação, e potenciadores de adenovírus. Vide também Yaniv, *Nature*, 297:17-18 (1982) sobre elementos de intensificação para ativação de promotores eucarióticos. O potenciador pode ser unido no vetor em uma posição a 5' ou 3' da sequência de codificação do peptídeo, mas está preferivelmente localizado em um local a 5' do promotor.

[00239] Os vetores de expressão utilizados em células eucarióticas hospedeiras (por exemplo, células de leveduras, fungos, insetos, plantas, animais, humanas ou nucleadas de outros organismos multicelulares) conterão também sequências necessárias para a terminação da transcrição e para a estabilização do mRNA. Tais sequências estão comumente disponíveis a partir da extremidade 5' e, ocasionalmente a 3', regiões não traduzidas dos DNA ou cDNA eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleotídeos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do mRNA que codifica a proteína da invenção. Um componente de terminação da transcrição útil é a região de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino. Vide WO 94/11026 e o vetor de expressão aqui divulgado.

[00240] O DNA recombinante pode também incluir qualquer tipo de sequência de marcação de proteínas que possa ser útil para a purificação da proteína. Exemplos de marcadores de proteínas incluem, mas não estão limitados a, um marcador de histidina, um marcador FLAG, um marcador myc, um marcador HA, ou um marcador GST. Os vetores de clonagem e expressão apropriados para utilização com hospedeiros celulares de bactérias, fungos, leveduras e mamíferos

podem ser encontrados em Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, Nova Iorque (1985)), cuja descrição relevante é aqui incorporada por referência.

[00241] O construto de expressão é introduzido na célula hospedeira utilizando um método apropriado para a célula hospedeira, como será evidente para um versado na técnica. Uma variedade de métodos para a introdução de ácidos nucleicos em células hospedeiras são conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitado a, eletroporação; transfecção emprego de cloreto de cálcio, cloreto de rubídio, fosfato de cálcio, DEAE-dextrano, ou outras substâncias; bombardeamento de microprojéteis; lipofecção; e infecção (quando o vetor é um agente infeccioso).

[00242] Células hospedeiras adequadas incluem procaríotas, leveduras células de mamíferos, ou células bacterianas. Bactérias adequadas incluem organismos gram negativos ou gram positivos, por exemplo, *E. coli* ou *Bacillus* spp. Levedura, preferivelmente das espécies de *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*, podem também ser utilizadas para a produção de polipeptídeos. Vários sistemas de cultura de células de mamífero ou de inseto podem também ser empregues para expressar as proteínas recombinantes. Os sistemas de baculovírus para produção de proteínas heterólogas em células de inseto são revistos por Luckow et al. (*Bio/Technology* 6:47 (1988)). Exemplos de linhagens celulares hospedeiras de mamífero adequadas incluem as células endoteliais, as células COS-7 de rim de macaco, CV-1, células L, C127, 3T3, ovário de hamster chinês (CHO), células embrionárias de rim humano, HeLa, 293, 293T, e linhagens celulares BHK. Polipeptídeos purificados são preparados por cultura de sistemas de vetor / hospedeiro adequados para expressar as proteínas recombinantes. Para muitas aplicações, o pequeno tamanho de muitos dos polipeptídeos aqui descritos iria tornar a expressão em *E. coli* como

o método preferido para a expressão. A proteína é em seguida purificada a partir de meios de cultura ou extratos celulares.

## **VI. Produção de Proteínas**

[00243] A presente invenção é também dirigida a linhagens celulares que expressam um anticorpo Adnectina antimiostatina ou polipeptídeo de fusão. Criação e isolamento de linhagens celulares que produzem uma Adnectina antimiostatina podem ser realizados utilizando técnicas padrão conhecidas na área, tais como as aqui descritas.

[00244] As células hospedeiras são transformadas com os vetores de clonagem ou expressão aqui descritos ou com a produção de proteínas e cultivadas em meios de nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes, ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas. Nos exemplos aqui apresentados, as células hospedeiras utilizadas para a produção de proteínas de alto rendimento (HTPP) e produção em média escala, foram os da cepa bacteriana HMS174.

[00245] Adnectinas da presente invenção também podem ser obtidas na forma aglicosilada produzindo as Adnectinas em, por exemplo, células procarióticas (por exemplo, *E. coli*). Notavelmente, as formas aglicosiladas de Adnectinas da invenção exibem a mesma afinidade, potência, e mecanismo de ação que Adnectinas glicosiladas quando testadas *in vitro*.

[00246] As células hospedeiras utilizadas para produzir as proteínas da presente invenção podem ser cultivadas em uma variedade de meios. Os meios comercialmente disponíveis tais como F10 de Ham (Sigma), Meio Essencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e meio Dulbecco modificado de Eagle ((DMEM), Sigma)) são adequados para cultura das células hospedeiras. Além disso, muitos dos meios descritos em Ham et al., *Meth. Enzymol.*, 58:44 (1979), Barites et al., *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980), U.S. Pat. Nos. 4,767,704,

4,657,866, 4,927,762, 4,560,655, 5,122,469, 6,048,728, 5,672,502, ou Pat. U.S. No. RE 30,985 podem ser utilizados como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (tais como insulina, transferrina, ou fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleotídeos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como a droga gentamicina), elementos vestigiais (definidos como compostos inorgânicos usualmente presentes em concentrações finais na gama micromolar), e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos nas concentrações apropriadas que seriam conhecidas dos versados na técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e semelhantes, são as previamente utilizadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e serão evidentes para o versado na técnica.

[00247] As proteínas aqui reveladas podem também ser produzidas usando sistemas de tradução de células. Para estes fins os ácidos nucleicos que codificam o polipeptídeo devem ser modificados para permitir a transcrição in vitro para produzir mRNA e para permitir a tradução isenta de células de mRNA no sistema isento de células particular a ser utilizado (eucariótico tal como sistema de tradução livre de células de levedura ou de mamífero ou procariótico, tal como um sistema de tradução livre de células bacterianas).

[00248] As proteínas da presente invenção também podem ser produzidas por síntese química (por exemplo, pelos métodos descritos em Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, The Pierce Chemical Co., Rockford, 111. (1984)). Modificações na proteína também podem ser produzidas por síntese química.

[00249] As proteínas da presente invenção podem ser purificadas por métodos de isolamento / purificação de proteínas em geral conhecidos na área da química de proteínas. Os exemplos não limitativos incluem extração, recristalização, dessalinização (por exemplo, com sulfato de amônio ou sulfato de sódio), centrifugação, diálise, ultrafiltração, cromatografia de adsorção, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica, cromatografia de fase normal, cromatografia de fase reversa, filtração em gel, cromatografia de permeação em gel, cromatografia de afinidade, eletroforese, distribuição em contracorrente ou quaisquer combinações destes. Após purificação, os polipeptídeos podem ser trocados em diferentes tampões e/ou concentrados por qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitado a, a filtração e diálise.

[00250] O polipeptídeo purificado é de preferência pelo menos 85% puro, ou, de preferência, pelo menos, 95% puro, e mais de preferência pelo menos 98% puro. Independentemente do valor numérico exato da pureza, o polipeptídeo é suficientemente puro para utilização como um produto farmacêutico.

## **VII. Caracterização Biofísica e Bioquímica**

[00251] A ligação de um anticorpo Adnectina antimiostatina da presente invenção a uma molécula alvo (por exemplo, a miostatina) pode ser avaliada em termos de constantes de equilíbrio (por exemplo, dissociação,  $K_D$ ) e em termos de constantes cinéticas (por exemplo, em taxa constante,  $k_{on}$  e sem taxa constante,  $k_{off}$ ). Uma Adnectina geralmente liga-se a uma molécula alvo com uma  $K_D$  inferior a 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 200 pM, ou 100 pM, valores de  $K_D$  mais elevados podem ser tolerados quando a  $k_{off}$  é suficientemente baixa ou a  $k_{on}$ , é suficientemente alta.

### ***Ensaio in vitro para Afinidade de Ligação***

[00252] Adnectinas antimioestatina que se ligam a e antagonizam mioestatina podem ser identificadas utilizando vários ensaios in vitro. Preferivelmente, os ensaios são ensaios de elevado rendimento que permitem triar múltiplos candidatos de Adnectinas simultaneamente. Em algumas modalidades, BMP-11, que compartilha identidade de aminoácidos de 90% com a mioestatina, pode ser utilizado como um substituto para a mioestatina, em ensaios in vitro, quando o ensaio é realizado sob condições de saturação. Notavelmente, Adnectinas antimioestatina fundidas com domínios Fc podem ligar-se a ambos mioestatina e BMP-11, ao passo que monoAdnectinas ligam-se preferivelmente a mioestatina. Sem estar limitado pela teoria, isto pode refletir a maior avidéz de Adnectinas fundidas com Fc bivalente em comparação com Adnectinas monovalentes. Semelhante ligação aumentada a BMP11 é observada com Adnectinas bivalentes PEGuiladas, tais como ATI-1341, as quais compreendem Adnectinas fundidas com duas extremidades de uma porção de 20 kDa de PEG.

[00253] Exemplos de ensaios para a determinação da afinidade de ligação do Adnectinas antimioestatina estão descritos nos exemplos infra, e incluem, mas não estão limitados a, métodos de fase de solução, tais como o ensaio de exclusão cinética (KinExA) (Blake et al., *JBC* 1996;271:27677-85; Drake et al., *Anal Biochem* 2004;328:35-43), ressonância de plasmon de superfície (SPR) com o sistema de Biacore (Uppsala, Suécia) (Welford et al., *Opt. Quant. Elect.* 1991;23:1; Morton e Myszka, *Methods in Enzymology* 1998;295:268) e ensaios de fluorescência resolvida em tempo homogêneo (HTRF) (Newton et al., *J Biomol Screen* 2008;13:674-82; Patel et al., *Assay Drug Dev Technol* 2008;6:55-68).

[00254] Em algumas modalidades, as interações biomoleculares podem ser monitoradas em tempo real com o sistema Biacore, que utiliza SPR para detectar alterações no ângulo de ressonância de luz na

superfície de um filme fino de ouro sobre um suporte de vidro, devido a alterações no índice de refração da superfície até 300 nm de distância. Análise Biacore gera constantes de taxa de associação, constantes de taxa de dissociação, constantes de dissociação de equilíbrio, e constantes de afinidade. A afinidade de ligação é obtida por meio da avaliação de constantes de taxa de associação e dissociação usando um sistema de ressonância de plasmon de superfície Biacore (Biacore, Inc.). Um chip biossensor é ativado por acoplamento covalente do alvo. O alvo é em seguida diluído e injetado sobre o chip para obter um sinal em unidades de resposta de material imobilizado. Dado que o sinal em unidades de ressonância (RU) é proporcional à massa de material imobilizado, este representa uma gama de densidades alvo imobilizadas sobre a matriz. Dados de associação e dissociação são ajustados simultaneamente em uma análise global para resolver a expressão da taxa líquida para uma interação biomolecular de 1:1, obtendo-se valores de melhor ajuste para  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  e  $R_{max}$  (resposta máxima de saturação). As constantes de equilíbrio de dissociação para a ligação,  $K_D$ 's são calculados a partir das medições de SPR como  $k_{off}/k_{on}$ .

[00255] Em algumas modalidades, as Adnectinas antimiostatina da invenção exibem uma  $K_D$  no ensaio de afinidade de SPR descrito no Exemplo 6 de 500 nM ou menos, 400 nM ou menos, 300 nM ou menos, 200 nM ou menos, 150 nM ou menos, 100 nM ou menos, 90 ou menos nM, 80 nM ou menos, 70 ou menos nM, 60 nM ou menos, de 50 nM ou menos, de 40 nM ou menos, 30 ou menos nM, 20 nM ou menos, ou 15 nM menos, 10 nm ou menos, 5 nm ou menos, ou 1 nm ou menos. De preferência, a  $K_D$  é de 15 nM ou menos. Mais preferivelmente, a  $K_D$  é de 2,0 nM ou menos.

[00256] Em algumas modalidades, o Adnectinas antimiostatina da presente invenção exibem um  $IC_{50}$  no ensaio de HTRF descrito no

Exemplo 4 de 5 nM ou menos, 4 ou menos nM, 3 nM ou menos, de 2,5 nM ou menos, de 2 nM ou menos, 1,5 nM ou menos, de 1 nM ou menos, de 0,5 nM ou menos, de 0,2 nM ou menos, ou de 0,1 nM ou menos. De preferência, a IC50 é de 1,5 nM ou menos. Mais de preferência, a IC50 é de 0,5 nM ou menos.

[00257] Em algumas modalidades, as Adnectinas antimioestatina da invenção exibem  $K_D$  no ensaio de exclusão cinético descrito no Exemplo 7 de 2 nM ou menos, de 1,5 nM ou menos, 1 nM ou menos, 900 pM ou menos, 850 pM ou menos, 800 pM ou menos, 750 pM ou menos, 700 pM ou menos, 650 pM ou menos, 600 pM ou menos, 550 pM ou menos, 500 pM ou menos, 450 pM ou menos, 400 pM ou menos, 350 pM ou menos, 340 pM ou menos, 330 pM ou menos, 300 pM ou menos, 250 pM ou menos, 200 pM ou menos, 150 pM ou menos, ou 100 pM ou menos. De preferência, a  $K_D$  é de 850 pM ou menos.

[00258] Deve ser entendido que os ensaios aqui descritos acima são exemplares, e que qualquer método conhecido na técnica para determinar a afinidade de ligação entre as proteínas (por exemplo, transferência baseada em fluorescência (FRET), ensaio imunossorvente ligado a enzima, e ensaios de ligação competitiva (por exemplo, radioimunoensaios)) pode ser utilizado para avaliar as afinidades de ligação das Adnectinas antimioestatina da invenção.

### ***Ensaio in vitro para Atividade Antagonista***

[00259] A capacidade de Adnectinas antimioestatina para antagonizar a atividade da mioestatina pode ser facilmente determinada utilizando vários ensaios in vitro. Preferivelmente, os ensaios são ensaios de elevado rendimento que permitam triar múltiplos candidatos de Adnectinas simultaneamente. Em algumas modalidades, os efeitos antagonistas de Adnectinas antimioestatina sobre a atividade da mioestatina podem ser determinados em ensaios de repórter de elemento responsivo de activina (ARE)-luciferase baseado em célula, tal como

descrito no Exemplo 3. Em certas modalidades, as Adnectinas antimiostatina da invenção diminuem a atividade ARE-luciferase induzida por miostatina em pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80 %, pelo menos 90% ou mais em relação a um controle ao coincubar miostatina com uma Adnectina antimiostatina antes da estimulação das células com a mistura. Uma reação de controle exemplar envolve o tratamento de células com miostatina sozinha ou miostatina pré-incubada com um excesso de um inibidor de miostatina de referência, tais como Quimera Humana de Activina RIIB Fc (R&D Systems) ou ActRIIb-Fc, tal como descrito em Morrison et al. (*Experimental Neurology* 2009; 217:258-68). Em outras modalidades, as Adnectinas antimiostatina da invenção inibem a atividade de repórter ARE-luciferase com um IC50 de 500 nM ou menos, 400 nM ou menos, 300 nM ou menos, 200 nM ou menos, 100 nM ou menos, ou 50 nM menos, 10 nm ou menos, 5 nm ou menos, 1 Nm, 0,5 nm ou menos, 0,4 nm ou menos, 0,3 nm ou menos, 0,2 nm ou menos, ou 0,10 nm ou menos, como descrito no Exemplo 3.

[00260] Em outras modalidades, os efeitos antagonistas de Adnectinas antimiostatina sobre a atividade da miostatina podem ser determinados através da medição da extensão da SMAD fosforilação nas células tratadas com a miostatina, como descrito no Exemplo 5. Em certas modalidades, as Adnectinas antimiostatina da invenção diminuiram fosforilação de SMAD induzida por miostatina em pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80 %, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou, pelo menos, 97% ou mais em relação a um controle com a coincubação de miostatina com uma Adnectina antimiostatina antes da estimulação das células com a mistura. Uma reação de controle exemplar envolve o tratamento de células com

miostatina sozinha ou miostatina pré-incubada com um excesso de um inibidor de miostatina de referência, tais como Quimera Humana de Activina RIIb Fc (R&D Systems) ou ActRIIb-Fc, tal como descrito em Morrison et al. (*Experimental Neurology* 2009; 217:258-68). Em algumas modalidades, as Adnectinas antimioestatina da invenção inibem a fosforilação de SMAD com uma IC50 de 1 nM ou menos, de 0,8 nM ou menos, de 0,6 nM ou menos, de 0,4 nM ou menos, de 0,3 nM ou menos, de 0,2 nM ou menos, ou 0,1 nM ou menos em uma resposta de inibição de 12 pontos ou 4 pontos, tal como descrito no Exemplo 5. Em outras modalidades, as Adnectinas antimioestatina da invenção inibem 10 nM de fosforilação de SMAD por miostatina em pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, ou, pelo menos, 98% ou mais, tal como descrito no Exemplo 5.

[00261] Além disso, vários sistemas *in vitro* modelo são conhecidos que usam células, cultura de tecidos e métodos histológicos para estudar a doença do neurônio motor. Por exemplo, uma parte organotípica da medula espinhal de rato submetida à excitotoxicidade de glutamato é útil como um sistema modelo para testar a eficácia de Adnectinas antimioestatina na prevenção da degeneração de neurônios motores. Corse et al., *Neurobiol. Dis.* (1999) 6: 335 346. Para uma discussão de sistemas *in vitro* para uso no estudo do ALS, vide, por exemplo, Bar, P. R., *Eur. J. Pharmacol.* (2000) 405:285 295; Silani et al., *J. Neurol.* (2000) 247 Suppl 1:128 36; Martin et al., *Int. J. Mol. Med.* (2000) 5:3 13.

[00262] Deve ser entendido que os ensaios aqui descritos são exemplares e que qualquer método conhecido na técnica que possa servir como uma leitura para a atividade da miostatina é adequado para utilização em testes de efeito antagonizantes de miostatina das

Adnectinas antimioestatina da invenção (p.ex., RT-PCR em tempo real de mRNA de genes alvo SMAD (por exemplo, Smad 7; Ciarmela et al., *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011; 96; 755-65) ou mRNA de genes contendo ARE).

### **Modelos In vivo**

[00263] Vários modelos animais reconhecidos na técnica existentes que recapitulam os sintomas de doenças, distúrbios e condições associadas com perda de massa muscular, por exemplo, com distúrbios musculares, neuromusculares, neurológicas e metabólicas. Estes modelos podem ser utilizados para testar a eficácia das Adnectinas antimioestatina da invenção.

[00264] Por exemplo, exemplos não limitativos de tais modelos animais incluem, por exemplo, o modelo de camundongo com distrofia muscular ligado a X (mdx) (US2011/0008375, Gehrig et al., *Nature* 2012; 484: 394-8), incluindo quatro cepas adicionais de mdx de camundongo - *mdx2cv*, *mdx3cv*, *mdx4cv*, ou *mdx5cv* mouse (Phelps et al., *Human Molecular Genetics*. 1996;5(8):1149–1153), o mdx de camundongo com ablação adicional da utrofina homóloga de distrofina utrophin (*mdx/utr<sup>-/-</sup>*) (Deconinck et al., *Cell*. 1997;90(4):717–727), o camundongo C57BL/6 alfa-SG-nulo (Duclos et al. (1998) *J. Cell Biol.* 142, 1461-1471), e aqueles recentemente revistos em Nakamura et al., (*J Biomed Biotechnol.* 2011; Article ID No: 184393), por exemplo, o camundongo mdx52, em que o éxon 52 do gene DMD de murino é excluído, o modelo de distrofia muscular de Golden Retriever (GRMD), o modelo canino de Distrofia Muscular ligado ao X (CXMDj), e o modelo de Hipertrofia de Distrofia Muscular de Felino (HFMD) (por exemplo, Shelton et al., *Neuromuscular Disorders*. 2005;15(2):127–138).

[00265] Modelos animais para o estudo de doenças de neurônios motores, tais como ALS são camundongos transgênicos com um gene (mSODIG93A e/ou mSODIG37R) de superóxido dismutase (SOD1)

Cu/Zn mutante ligado a ALS. Estes camundongos desenvolvem um distúrbio paralítico na idade adulta dominante herdado com muitas das características clínicas e patológicas de familiar ALS. (Por exemplo, Gurney et al., *Science* (1994) 264: 1772-1775; Nagano et al., *Life Sci* (2002) 72: 541-548). Outros modelos animais incluem dois modelos murinos que ocorrem naturalmente para neuropatia motora progressiva (PMN) e wobbler (Haeggeli and Kato, *Neurosci Lett* (2002) 335: 39-43). Para uma revisão de vários modelos animais para uso em estudo de doenças de neurônios motores, como ALS, vide, por exemplo, Jankowsky et al., *Curr Neurol Neurosci. Rep.* (2002) 2:457-464; Elliott, J. L., *Neurobiol. Dis.* (1999) 6:310-20; e Borchelt et al., *Brain Pathol.* (1998) 8:735-757.

[00266] Modelos animais de outras doenças neurodegenerativas ou neuropatológicas, além de ALS incluem um modelo de camundongo transgênico para avaliar atrofia muscular espinhal e bulbar (SBMA) (Katsuno et al., *Neuron* (2002). 35: 843-854), modelos animais para a poliomielite paralisante humana (Ford et al., *Microb. Pathog.* (2002) 33:97-107), modelos animais da atrofia muscular espinhal (Schmid et al., *J. Child Neurol.* 22, 1004-1012, 2007), modelos animais para a miopatia distal e miopatia de corpo de inclusão hereditária (Malicdan et al., *Acta Myol* 2007 Dezembro; 26 (3): 171-175), modelo murino de doença desmielinizante genética (Suzuki et al., *Microsc Res tecnologia* 1995; 32: 204-214), e aquelas descritas por Meyer ZuHorste et al. (*Curr. Opin. Neurol.* 2006; 19: 464-473).

[00267] Os modelos animais para testar a eficácia das Adnectinas antimiotatina da invenção contra a perda de volume devido à atrofia e/ou inatividade muscular incluem, mas não estão limitados a, modelos de camundongo de imobilização unilateral Madaro et al., *Basic Applied Myology* 2008;18:149-153), laceração do tendão de Aquiles (tenotomia) (Bialek et al., *Physiol Genomics* 2011;43:1075-86), e aqueles descritos

em Powers et al. (*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R337-44), tais como, a suspensão dos membros posteriores dos animais, imobilização do membro, e ventilação mecânica controlada.

[00268] Modelos animais relevantes para testar a eficácia da Adnectinas antimiosstatina da invenção no tratamento de distúrbios metabólicos incluem, mas não estão limitados a, os divulgados na Ramaro et al. (*Indian J Med Res* 2007;125:451-472) e Kennedy et al. (*Disease Models & Mechanisms* 2010;3:156-166), ambos os quais são aqui incorporados por referência na sua totalidade). Exemplos não limitantes de tais modelos animais incluem camundongos Lep<sup>ob/ob</sup>, camundongos Lepr<sup>db</sup>, camundongos Kuo Kondo, camundongos KK<sup>Ay</sup>, camundongos Obesos da Nova Zelândia (NZO), camundongos NONcNZO10, camundongos Obesos de Diabetes Tsumara Suzuki (TSOD) e Não Obesos Tsumara Suzuki (TSNO), camundongos M16, ratos gordos Zucker, ratos gordos diabéticos Zucker, ratos SHR/N-cp, ratos JCR/LA -cp, ratos gordos Otsuka Long Evans Tokushima, macacos rhesus Obesos, ratos diabéticos Cohen, ratos Goto-Kakizaki, e camundongos C57 BL/6 (Akita) não obesos mutantes. A diabetes do tipo 2 também pode ser induzida por dieta por, por exemplo, alimentar camundongos não obesos, C57BL6 não diabéticos com alimentação com alto teor de gordura (Surwit et al., *Diabetes* 1988; 37:1163-7). A diabetes do tipo 2 também pode ser quimicamente induzida com, por exemplo, goldtioglicose (Le Marchand Brustel et al., *Am J Physiol* 1978; 234: E348-58) ou estreptozotocina, ou induzida cirurgicamente (por exemplo, animais diabéticos parcialmente pancreatomizados) (McNeil JH., *Experimental models of diabetes*. Florida, US: CRC Press LLC; 1999; Sasaki et al., *In Vivo* 2000;14:535-41). Vários modelos animais genéticos são também conhecidos para recapitular os sintomas e fenótipos de distúrbios metabólicos, tais como

aqueles revistos em Kennedy et al., 2010 (supra).

[00269] Em algumas modalidades, a eficácia das Adnectinas antimioestatina da invenção para aumentar a massa muscular ou volume pode ser testada por injeção subcutânea de camundongos, como descrito no Exemplo 9. Dado que a inibição da mioestatina aumenta a massa muscular, as Adnectinas antimioestatina da invenção são esperadas para aumentar o peso corporal e massa muscular, à medida que podem ser utilizadas para determinar a potência das Adnectinas.

[00270] Em algumas modalidades, particularmente quando as Adnectinas antimioestatina são imunogênicas em camundongos (por exemplo, devido ao uso do domínio de fibronectina humana tipo III) e tratamentos crônicos são desejados, as Adnectinas antimioestatina da invenção podem ser administrados a camundongos SCID, que são incapazes de montar as respostas imunes celulares ou humorais. Em algumas modalidades, os camundongos SCID podem ser cruzados com outros modelos genéticos, tais como os aqui descritos (por exemplo, camundongos diabéticos), para desenvolver um modelo de camundongo imunocomprometido passível de tratamento crônico com as Adnectinas antimioestatina da invenção.

### **VIII. Aplicações Terapêuticas**

[00271] Em um aspecto, a presente invenção proporciona Adnectinas antimioestatina úteis para o tratamento de doença relacionadas com mioestatina ou distúrbios, por exemplo, distúrbios de perda muscular, atrofia muscular, distúrbios metabólicos, e distúrbios degenerativos ósseos. Assim, em certas modalidades, a invenção proporciona métodos para atenuar ou inibir uma doença ou um distúrbio relacionado com a mioestatina em um indivíduo que compreende a administração de uma quantidade eficaz de polipeptídeo de ligação a mioestatina, ou seja, uma Adnectina antimioestatina, a um indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em algumas

modalidades, as Adnectinas antimioestatina são farmacologicamente aceitáveis para um mamífero, em particular um humano. Um polipeptídeo "farmacologicamente aceitável" refere-se a um polipeptídeo que é administrado a um animal sem consequências médicas adversas significativas, tais como os níveis essencialmente livres de endotoxina, ou endotoxina muito baixa.

[00272] Em algumas modalidades, as Adnectinas antimioestatina da presente invenção irão ser administradas a um indivíduo em combinação (simultânea ou separadamente) com um agente conhecido na técnica como sendo útil para o distúrbio particular ou doença a ser tratada.

[00273] Em algumas modalidades, a população de pacientes alvo para a terapia com Adnectina antimioestatina é uma que não é favorável à terapia padrão para a doença, distúrbio ou estado a ser tratado devido a, por exemplo, idade, condições pré-existentes, composição genética e/ou co-morbidades. As Adnectinas antimioestatina da invenção podem servir como alternativas às terapias existentes que estão associadas com efeitos colaterais substanciais (por exemplo, desempenho reprodutivo) ou preocupações de segurança.

[00274] Exemplos de doenças, distúrbios e condições para as quais as Adnectinas antimioestatina da presente invenção irão ser úteis são descritas em mais detalhe abaixo.

### ***Doenças e Distúrbios Musculares, Neurológicos, e Metabólicos***

[00275] As Adnectinas antimioestatina da presente invenção podem ser utilizadas para tratar distúrbios musculares, neurológicos e metabólicos associados com a perda de massa muscular e/ou a atrofia muscular. Por exemplo, a sobre-expressão da mioestatina in vivo induz sinais e sintomas característicos de caquexia, e agentes ligantes de mioestatina podem resolver parcialmente o efeito de perda muscular de mioestatina (Zimmers et al., Science 2002; 296: 1486-8). Pacientes com

AIDS também apresentam aumento dos níveis séricos de material imunorreativo de miostatina comparados aos pacientes sem AIDS ou pacientes com AIDS que não apresentam perda de peso (Gonzalez-Cadavid et al., *PNAS* 1998; 95: 14938-43). Também tem sido observado que eliminação específica de coração de miostatina reduz a atrofia do músculo esquelético em camundongos com insuficiência cardíaca, e, inversamente, especificamente sobre-expressar miostatina no coração é suficiente para induzir a perda de massa muscular (Breitbart et al., *AJP-Heart*; 2011; 300:H1973-82). Em contraste, os camundongos knockout de miostatina mostraram aumento da massa muscular, e uma diminuição dependente de idade do acúmulo de gordura em comparação com os seus homólogos do tipo selvagem (McPherron et al., *J. Clin Invest* 2002; 109: 595-601).

[00276] Exemplos de distúrbios que podem ser tratados de acordo com os métodos da invenção incluem miopatias e neuropatias, incluindo, por exemplo, doença do neurônio motor, e distúrbios neuromusculares e neurológicos.

[00277] Por exemplo, Adnectinas antimioestatina podem ser usadas para tratar miopatias hereditárias e doenças neuromusculares (por exemplo, distrofia muscular (Gonzalez-Kadavid et al., *PNAS*, 1998; 95: 14938-43), distúrbios dos neurônios motores, (miopatias congênitas, miopatias inflamatórias e miopatias metabólicas), bem como miopatias adquiridas (por exemplo, miopatia induzida por drogas, miopatia induzida por toxina, miopatia induzida por infecção, miopatia paraneoplásica e outras miopatias associadas com as doenças críticas).

[00278] Tais distúrbios incluem, mas não estão limitados a, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular progressiva, distrofia muscular tipo Becker, distrofia muscular de Dejerine-Landouzy, distrofia muscular de Erb, distrofia muscular de Emery Dreifuss, distrofia muscular de cintura e membros, distrofia muscular oculofaríngea

(OPMD), distrofia muscular facioscapulohumeral, distrofia muscular congênita, distrofia muscular neuroaxonal infantil, distrofia miotônica (doença de Steinert), distrofia muscular distal, miopatia nemalina, paralisia periódica familiar, miotonia não distrófica, paralisias periódicas, atrofia muscular espinhal, atrofia muscular espinhal (AME), esclerose lateral amiotrófica (ELA), esclerose lateral primária (PLS), atrofia muscular progressiva (PMA), miopatia distal, miopatia miotubular / centronuclear, miopatia nemalina, doença de mini núcleo, doença de núcleo central, desminopatia, miosite de corpos de inclusão, dermatomiosite, polimiosite, miopatia mitocondrial, síndrome miastênica congênita, miastenia grave, disfunção muscular pós-pólio, miopatia esteróide, miopatia alcoólica, atrofia muscular perioperatório e neuromiopatia UTI.

[00279] Neuropatias e radiculopatias herdadas e adquiridas que podem ser tratadas com Adnectinas antimioestatina incluem, mas não estão limitadas a, síndrome da espinha rígida, doença cerebral do músculo do olho, neuropatia sensorial e motora hereditária, doença de dente de Carcot-Marie, neuropatia inflamatória crônica, neuropatia hipertrófica progressiva, neuropatia tomaculous, lúpus, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, esclerose múltipla, sarcoidose, neuropatia diabética, neuropatia alcoólica, neuropatias relacionadas com doenças (por exemplo, VIH/AIDS, doença de Lyme), neuropatias relacionadas a toxina (por exemplo, metais pesados, quimioterapia), neuropatias de compressão (por exemplo, tumores, neuropatia de aprisionamento), e neuropatias associadas com uma lesão ou trauma (por exemplo, síndrome da cauda equina, paraplegia, tetraplegia).

[00280] Em algumas modalidades, as Adnectinas antimioestatina da invenção podem ser utilizadas para tratar distrofias musculares (por exemplo, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular tipo

Becker), ALS, e sarcopenia.

[00281] Distúrbios adicionais associados com perda de massa muscular que podem ser tratadas com os Adnectinas antimiostatina da invenção incluem caquexia, síndrome de perda, sarcopenia, doença pulmonar obstrutiva congestiva, fibrose cística (caquexia pulmonar), doença cardíaca ou insuficiência (caquexia cardíaca), câncer, perda devido à AIDS, perda por insuficiência renal, doença renal, claudicação, caquexia associada com a diálise, uremia, artrite reumatóide, lesão muscular, cirurgia, reparação de danos musculares, fraqueza, atrofia por desuso, osteoporose, osteoartrite, crescimento do ligamento e reparação.

[00282] Os métodos da invenção também podem ser usados para aumentar o volume muscular nos indivíduos que sofrem de atrofia muscular devido ao desuso. Atrofia por desuso pode resultar de várias causas, incluindo qualquer doença ou estado que leve a imobilidade ou desuso prolongado, incluindo, mas não limitado a repouso absoluto, sendo cadeira de rodas prolongada, imobilização dos membros, descarga do diafragma através de ventilação mecânica, transplante de órgão sólido, substituição de articulações, acidente vascular cerebral, fraqueza relacionada a danos no CNS, lesão medular, recuperação de queimaduras graves, hemodiálise crônica sedentária, recuperação pós-trauma, recuperação pós-sepsia e exposição a microgravidade (Powers et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R337-44).

[00283] Além disso, os aumentos relacionados com a idade em gordura para relação muscular e atrofia muscular relacionada com a idade parecem estar relacionados com a miostatina. Por exemplo, a proteína de soro imunorreativa a miostatina média aumentou com a idade em grupos de jovens (19-35 anos de idade), meia-idade (36-75 anos de idade) e idosos (76-92 anos de idade) homens e mulheres, enquanto a massa muscular média e massa isenta de gordura diminuiu

com a idade nestes grupos (Yarasheski et al J Nutr Aging 6 (5): 343-8 (2002)). Assim, indivíduos com atrofia muscular devido ao envelhecimento, e/ou indivíduos que são frágeis devido a, por exemplo, sarcopenia, também se beneficiariam de tratamento com estatina, as Adnectinas antimiostatina da invenção.

[00284] Também contemplados são os métodos para aumentar a massa muscular em animais para consumo humano pela administração de uma dosagem eficaz das Adnectinas antimiostatina a estes animais. Uma vez que o polipeptídeo de miostatina madura C-terminal é idêntico em todas as espécies, Adnectinas antimiostatina seriam esperadas para aumentar eficazmente a massa muscular e reduzir gordura em quaisquer espécies agronomicamente importantes, por exemplo, mas não se limitando a, gado, galinha, peru, e suínos.

[00285] A eficácia da Adnectina antimiostatina no tratamento de distúrbios de perda muscular ou atrofia muscular pode ser determinada, por exemplo, por um ou mais métodos para medir um aumento da massa muscular ou volume, um aumento no número de células musculares (hiperplasia), um aumento do tamanho das células musculares (hipertrofia) e/ou um aumento na força muscular. Por exemplo, efeitos de aumento do volume muscular das Adnectinas antimiostatina da presente invenção são demonstrados nos exemplos descritos infra. Os métodos para determinar a "aumento da massa muscular" são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, o conteúdo do músculo pode ser medido antes e depois da administração de uma Adnectina antimiostatina da invenção, utilizando técnicas convencionais, tais como pesagem debaixo de água (vide, por exemplo, Bhasin et al. New Eng. J. Med. (1996) 335:1-7) e absorptiometria de raio x de energia dupla (vide, por exemplo, Bhasin et al. Mol. Endocrinol. (1998) 83:3155-3162). Um aumento no tamanho do músculo pode ser evidenciado pelo ganho de peso de, pelo menos, cerca de 5-10%, de

preferência pelo menos cerca de 10-20% ou mais.

### ***Distúrbios Metabólicos***

[00286] As Adnectinas antimiostatina da presente invenção, que reduzem a atividade da miostatina e/ou sinalização, são úteis para o tratamento de perturbações metabólicas, tais como obesidade, diabetes mellitus tipo II, distúrbios associados a diabetes, síndrome metabólica, e hiperglicemia.

[00287] A miostatina está envolvida na patogênese da diabetes mellitus tipo II. A miostatina é expressa no tecido adiposo e camundongos deficientes de miostatina exibem reduzido acúmulo de gordura à medida que envelhecem. Além disso, a carga de glicose, acúmulo de gordura, e o peso total do corpo é reduzido em miostatina ausente em camundongos letal cutia amarelo e obeso (*Lep<sup>ob/ob</sup>*) (Yen et al., FASEB J. 8: 479, 1994; McPherron et al., 2002). Tal como divulgado em US2011/0008375, antagonistas de miostatina podem diminuir a proporção gordura / músculo em um modelo de rato com idade, preservar a massa muscular esquelética e massa corporal magra, e atenuar a hipertrofia renal em camundongos diabéticos induzidos por STZ.

[00288] Tal como aqui utilizado, "obesidade" é uma condição na qual o excesso de gordura corporal se acumulou de tal forma que a saúde pode ser afetada negativamente. Ela é comumente definida como um índice de massa corporal (IMC) de 30 kg/m<sup>2</sup> ou superior que o distingue de estar acima do peso, tal como definido por um IMC de 25 kg/m<sup>2</sup> ou superior (vide, por exemplo, World Health Organization (2000) (PDF). Technical report series 894: Obesity: Preventing e managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization). Excesso de peso corporal está associado a várias doenças, principalmente doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, apnéia obstrutiva do sono, alguns tipos de câncer e osteoartrite.

[00289] Um indivíduo com a obesidade pode ser identificado, por exemplo, por determinação do IMC (IMC é calculado dividindo-se a massa do objeto pelo quadrado da sua altura), relação entre as circunferências da cintura e cintura-quadril (a circunferência da cintura absoluta (> 102 cm nos homens e >88 cm nas mulheres) e relação cintura-quadril (a circunferência da cintura dividida pela dos quadris de >0,9 para homens e >0,85 para mulheres) (vide, por exemplo, Yusuf S, et al., (2004). Lancet 364: 937-52), e/ou a percentagem de gordura corporal (gordura corporal total, expressa como uma percentagem do peso corporal total: os homens com mais de 25% de gordura corporal e mulheres com mais de 33% de gordura corporal são obesos; percentagem de gordura corporal pode ser estimada a partir de IMC de uma pessoa através da seguinte fórmula: % de gordura corporal =  $(1.2 * \text{IMC}) + (0,23 * \text{idade}) - 5,4 - (10,8 * \text{gênero})$ , onde o gênero é 0 se do sexo feminino e 1 se do sexo masculino). Técnicas de medição de percentual de gordura corporal incluem, por exemplo, a tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (MRI), e absorção do raio X de dupla energia (DEXA).

[00290] O termo "diabetes tipo II" refere-se a uma doença crônica, de longa vida, que resulta quando a insulina do corpo não funciona eficazmente. O principal componente da diabetes tipo II é "resistência à insulina", em que a insulina produzida pelo pâncreas não consegue se conectar com as células de gordura e dos músculos para permitir que a glicose dentro produza energia, causando a hiperglicemia (glicose no sangue). Para compensar, o pâncreas produz mais insulina, e as células, percebendo essa enxurrada de insulina, tornam-se ainda mais resistentes, resultando em um ciclo vicioso de altos níveis de glicose e os níveis elevados de insulina, muitas vezes.

[00291] A frase "distúrbios associados com a diabetes" ou "distúrbios associados a diabetes" ou "distúrbios relacionados a diabetes", como

usado aqui, refere-se às condições e outras doenças que são comumente associadas ou relacionadas com a diabetes. Exemplo de distúrbios associados com diabetes incluem, por exemplo, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, resistência à insulina, metabolismo de glicose deficiente, obesidade, retinopatia diabética, degeneração macular, cataratas, nefropatia diabética, glomeruloesclerose, neuropatia diabética, disfunção erétil, síndrome pré-menstrual, restenose vascular, colite ulcerativa, doença cardíaca coronária, hipertensão, angina de peito, enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral, distúrbios de pele e tecidos conjuntivos, ulcerações dos pés, acidose metabólica, artrite, e osteoporose.

[00292] A eficácia das Adnectinas antimioestatina no tratamento de distúrbios metabólicos pode ser determinada, por exemplo, por um ou mais métodos de medir um aumento da sensibilidade à insulina, um aumento na captação de glicose pelas células a partir do indivíduo, uma diminuição dos níveis de glicose no sangue, e uma diminuição na gordura corporal.

[00293] Por exemplo, em indivíduos com diabetes tipo II, ou que estão em risco de desenvolvimento de níveis de HbA1c diabetes pode ser monitorizado. O termo "1AC hemoglobina" ou "HbA1c" como aqui utilizado refere-se ao produto de uma glicação não enzimática da cadeia B da hemoglobina. A faixa alvo desejada de níveis HbA1c para pessoas com diabetes pode ser determinada a partir de orientações de American Diabetes Association (ADA), ou seja, Padrões de Cuidado Médico em Diabetes (*Diabetes Care* 2012; 35 (Suppl 1): S511-563). Níveis alvo de HbA1c atuais são geralmente <7,0 para as pessoas com diabetes, e as pessoas que não têm diabetes geralmente têm valores HbA1c de menos de 6%. Por conseguinte, a eficácia das Adnectinas antimioestatina da presente invenção pode ser determinada por um decréscimo observado no nível de HbA1c em um indivíduo.

[00294] Os métodos da invenção incluem ainda a administração de uma Adnectina antimiostatina sozinha, ou em combinação com outros agentes que são conhecidos na técnica para o controle da glicemia (por exemplo, insulina, GLP1) ou para o tratamento de complicações relacionadas com a diabetes reconhecidas na técnica.

### ***Outros distúrbios***

[00295] Camundongos knockout de miostatina exibem aumento da massa muscular, bem como aumento do conteúdo mineral e densidade do úmero do camundongo, e aumento do conteúdo mineral do osso trabecular e cortical em regiões onde os músculos se ligam (Hamrick et al *Calcif Intl Tissue* 2002; 71: 63-8). Isto sugere que o aumento da massa muscular pode ajudar a melhorar a resistência óssea e reduzir a osteoporose e outras doenças ósseas degenerativas.

[00296] Doenças ou distúrbios adicionais para os quais as Adnectinas antimiostatina da presente invenção são úteis incluem a cicatrização de ferida, doença antifibrótica, Síndrome de Lambert-Eaton, e Doença de Parkinson.

### ***Terapias de combinação***

[00297] As Adnectinas antimiostatina aqui proporcionadas podem ser utilizadas em combinação com agentes antidiabéticos, agentes anti-hiperglicêmicos, agentes anti-hiperinsulinêmicas, agentes anti-retinopáticos, agentes antineuropáticas, agentes antineurodegenerativos, agentes antinefropática, agentes antiateroscleróticos, agentes anti-isquêmicos, agentes anti-hipertensivos, agentes antiobesidade, agentes antidislipídicos, agentes antidislipídicos, agentes anti-hiperlipidêmicos, agentes anti-hipertrigliceridêmicos, agentes anti-hipercolesterolêmicos, agentes anti-reestenose, agentes anti-pancreáticos, agentes de abaixamento de lipídios, agentes anoréticos, agentes de reforço da memória, agentes antidemência, ou agentes de promoção da cognição, supressores de

apetite, tratamentos neuro- ou musculo-reparadores, tratamentos para a insuficiência cardíaca, tratamentos para a doença arterial periférica e agentes anti-inflamatórios.

[00298] Os agentes antidiabéticos usados em combinação com as Adnectinas antimioestatina incluem, mas não estão limitados a, secretagogos de insulina ou sensibilizadores de insulina, moduladores do receptor GPR40, ou outros agentes antidiabéticos. Estes agentes incluem, mas não estão limitados a, inibidores de dipeptidil-peptidase IV (DP4) (por exemplo, sitagliptina, saxagliptina, alogliptina, vildagliptina e semelhantes), biguanidas (por exemplo, metformina, fenformina e semelhantes), sulfonilureias (por exemplo, gliburide, glimepirida, glipizida e similares), inibidores de glucosidase (por exemplo, acarbose, miglitol, e semelhantes), agonistas de PPAR $\gamma$ , tais como tiazolidinodionas (por exemplo, rosiglitazona, pioglitazona, e semelhantes), agonistas duplos de PPAR  $\alpha/\gamma$  (por exemplo, muraglitazar, tesaglitazar, aleglitazar, e semelhantes), ativadores da glucocinase (como descrito no Fyfe et al., *Drugs of the Future*, 34 (8):641-653 (2009) e aqui incorporado por referência), moduladores do receptor de GPR119 (CDC-2952, PSN821, APD597 e semelhantes), inibidores de SGLT2 (dapagliflozina, canagliflozin, remagliflozin e semelhantes), análogos de amilina, tais como pramlintida, e/ou insulina. Revisões de terapias emergentes e atuais para o tratamento da diabetes podem ser encontradas em: Mohler et al., *Medicinal Research Reviews*, 29(1):125-195 (2009), e Mizuno et al., *Current Medicinal Chemistry*, 15:61-74 (2008).

[00299] As Adnectinas antimioestatina da presente invenção também podem ser facultativamente utilizadas em combinação com um ou mais agentes hipofágicos tais como dietilpropiona, fendimetrazina, fentermina, orlistat, sibutramina, lorcaserina, pramlintida, topiramato, antagonistas do receptor de MCHR1, oxintomodulina, naltrexona,

peptídeo Amilina, moduladores do receptor de NPY Y5, moduladores do receptor de NPY Y2, moduladores do receptor NPY Y4, Cetilistat, moduladores de receptores 5HT2c, e semelhantes. As Adnectinas antimioestatina da presente invenção podem também ser utilizadas em combinação com um agonista do receptor de peptídeo 1 tipo glucagon (GLP-1R), tal como exenatida, liraglutida, GPR-1 (1-36) amida, GLP-1 (7-36) amida, GLP-1 (7-37) (como descrito na Pat. US No. 5.614.492 para Habener, cuja descrição é aqui incorporada por referência), que pode ser administrada através de injeção, por via intranasal, ou por dispositivos transdérmicos ou bucais. Revisões de terapias emergentes e atuais para o tratamento de obesidade podem ser encontradas em: Melnikova et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 5:369-370 (2006); Jones, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 8:833-834 (2009); Obici, *Endocrinology*, 150(6):2512-2517 (2009); e Elangbam, *Vet. Pathol.*, 46(1):10-24 (2009).

[00300] As Adnectinas antimioestatina da presente invenção também podem ser administradas com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, conforme apropriado para a doença ou o distúrbio em particular a ser tratada. Exemplos não limitativos de agentes adicionais incluem aqueles que são úteis para o tratamento de distúrbios metabólicos, tais como diabetes tipo II e sarcopenia e incluem, mas não estão limitados a, GLP-1, tipo GLP-1, amilina, e FGF21; aqueles que são úteis para o tratamento de doenças antifibróticas, doenças neuromusculares, doenças dos neurônios motores, e sarcopenia e incluem, mas não estão limitados a, grelina, SARM, Riluzole, testosterona, androg<sup>^</sup>nios, hormônio do crescimento, terapia de substituição hormonal, inibidores de COX-2, ativadores de troponina, agonistas  $\beta$ 2, anticorpos de CTLA4-Ig (por exemplo, abetacept, belatacept) e anti-TGF $\beta$ ; aqueles que são úteis para o tratamento da caquexia e outras síndromes de perda e incluem, mas não estão

limitados a, inibidores da quinase do receptor de TGFP, anti-IL-6, e inibidores de ubiquitina-proteassoma; aqueles que são úteis para tratar câibras musculares associadas com miotonia PLS e incluem, mas não estão limitados a fitoin, quinina, baclofeno e tizanidina; aqueles que são úteis para neuropatias incluem antidepressivos (por exemplo, tricíclicos e inibidores seletivos de recaptção de serotonina-norepinefrina (SNRI's)), anticonvulsivantes, cannbinoids, toxina botulínica tipo A, antagonistas de NMDA (por exemplo, cetamina), suplementos alimentares (por exemplo, ácido alfa-lipóico e Benfotiamina); aqueles que são úteis para o tratamento de neuropatias crônicas inflamatórias incluem, mas não estão limitados a, corticosteróides, imunoglobulina intravenosa, e imunossuppressores (por exemplo, ciclofosfamida, ciclosporina, azatioprina, mofetil micofenolato, globulina antitímócito, rituximab); e aqueles que são úteis para o tratamento da síndrome de Guillain-Barré, sarcopenia, fratura, e a perda óssea e incluem, mas não estão limitados a, Boniva (ibandronato) e PTH.

[00301] As Adnectinas antimioestatina da presente invenção podem ser administradas com um ou mais agentes adicionais utilizados na terapia sintomática. Exemplos não limitativos de tais agentes para tratar os sintomas de ALS incluem ativadores de poro da transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), ativadores rápidos de troponina esqueléticos, reguladores de macrófagos (por exemplo, NP001), agentes de tratamento de doenças de armazenamento lisossomal (por exemplo, NP003), e antagonistas do receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR). Um exemplo não limitativo de um agente adicional para o uso no tratamento dos sintomas de DMD / BMD é um agente que aumenta os níveis de ATP.

[00302] As Adnectinas antimioestatina da presente invenção também podem ser administradas com um ou mais agentes adicionais utilizados na terapia de modificação da doença. Exemplos não limitativos de tais

agentes para o tratamento de ALS incluem sequestrantes de radicais livres (por exemplo, edaravona (norfenazona), CV-3611), agonistas de VEGF (por exemplo, sNN0029), proteína I Nogo-A (por exemplo, GSK122324), inibidores de SOD1 (p.ex. , ISIS-SODIRx), e inibidores de sintase 1 PGE, (por exemplo, AAD-2004). Exemplos não limitativos de tais agentes para o tratamento de DMD / BMD incluem aquelas que promovem pulo de éxon (por exemplo, moléculas antissentido, tais como drisapersen (PRO051 / GSK2402968), PRO044, Eteplirsen, AVI-4658, AVI-5038, Ataluren (PTC 124)), agentes de terapia genética, agentes anti-inflamatórios (por exemplo, CRD007), e agentes antifibróticos (por exemplo, HT-100).

[00303] Como discutido acima, os agentes que promovem o pulo do éxon podem ser usados em combinação com as Adnectinas antimioestatina da presente invenção para o tratamento de distrofia muscular de Duchenne e distrofia muscular de tipo Becker. Exemplos de éxons específicos que podem ser direcionados para restaurar distrofina funcional incluem éxons 7, 8, 17, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53 e 55 (vide, por exemplo, Lu et al., *Molecular Therapy* 2011; 19: 9-15). Em algumas modalidades, mais do que um agente, por exemplo, oligonucleotídeos antissentido, podem ser utilizados para induzir pulo multi-éxon.

#### **IX. Composições Farmacêuticas**

[00304] A presente invenção proporciona ainda composições farmacêuticas que compreendem uma Adnectina antimioestatina ou proteínas de fusão das mesmas aqui descritas, em que a composição é essencialmente livre de endotoxina, ou, pelo menos, não contêm mais do que níveis aceitáveis de endotoxina, como determinado pela agência reguladora apropriada (por exemplo, a FDA).

[00305] As composições da presente invenção podem estar na forma de uma pílula, comprimido, cápsula, líquido, ou em comprimidos de

liberação prolongada para administração oral; um líquido para administração intravenosa, subcutânea ou administração parentérica; ou um gel, loção, pomada, creme, ou um polímero ou outro veículo de liberação sustentada para administração local.

[00306] Métodos bem conhecidos na técnica para a preparação de composições são encontrados, por exemplo, em "Remington: The Science e Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A. R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.). As composições para administração parentérica podem, por exemplo, conter excipientes, água estéril, solução salina, polialquilenoglicóis tais como polietilenoglicol, óleos de origem vegetal, ou naftalenos hidrogenados. Polímero de lactida biocompatível, biodegradável, copolímero de lactida / glicolida, ou copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno podem ser utilizados para controlar a liberação dos compostos. Composições nanoparticuladas (por exemplo, nanopartículas biodegradáveis, nanopartículas de lipídios sólidas, lipossomas) podem ser utilizadas para controlar a biodistribuição dos compostos. Outros sistemas de entrega parentérica potencialmente úteis incluem partículas de copolímero de acetato de vinil-etileno, bombas osmóticas, sistemas de infusão implantáveis e lipossomas. A concentração do composto na composição varia, dependendo de um número de fatores, incluindo a dosagem da droga a ser administrado, e a via de administração.

[00307] Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregues, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos tais como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de

baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextranos; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; sal de formação de contraíons tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de proteína Zn); e/ou surfactantes não iônicos tais como Tween, PLURONIC™ ou polietilenoglicol (PEG).

[00308] Os polipeptídeos da presente invenção podem ser administrados, opcionalmente, como um sal farmacologicamente aceitável, tal como sais de adição de ácido não tóxicos ou complexos de metais que são comumente utilizados na indústria farmacêutica. Exemplos de sais de adição de ácidos incluem ácidos orgânicos tais como ácido acético, láctico, pâmico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzóico, palmítico, subérico, salicílico, tartárico, metanossulfônico, toluenossulfônico, ou ácidos trifluoroacético ou similares; ácidos poliméricos tais como ácido tânico, carboximetilcelulose, ou outros do gênero; e ácido inorgânico tais como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ou similares. Complexos de metais incluem zinco, ferro, e outros semelhantes. Em um exemplo, o polipeptídeo é formulado na presença de acetato de sódio para aumentar a estabilidade térmica.

[00309] Os ingredientes ativos podem também ser aprisionados em uma microcápsula preparada, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de entrega de drogas coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina,

microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas na edição de Remington Pharmaceutical Sciences 16, Osol, A. Ed. (1980).

[00310] Preparações de liberação sustentada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrófobos sólidos que contêm as proteínas da invenção, matrizes essas que estão na forma de artigos moldados, por exemplo, filmes ou microcápsula. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato), ou poli (álcool vinílico)), polilactidos (Pat. U.S. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e y etil-L-glutamato, acetato de vinil-etileno não degradável, copolímeros degradáveis de ácido glicólico ácido láctico tais como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3- hidroxibutírico. Enquanto polímeros tais como acetato de vinil-etileno e ácido láctico-ácido glicólico permitem a liberação de moléculas durante mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando as proteínas encapsuladas da invenção podem permanecer no corpo durante um longo tempo, elas podem desnaturar ou agregar como resultado de exposição a umidade a 37 °C, resultando em uma perda de atividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser concebidas para a estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação é para ser formação de ligação S-S intermolecular através de intertoça de tio-dissulfureto, a estabilização pode ser alcançada modificando resíduos de sulfidrina, liofilizando a partir de soluções ácidas, controlando o teor de umidade, utilizando aditivos apropriados e desenvolvendo composições matriz polimérica específicas.

[00311] As composições da presente invenção para utilização oral incluem comprimidos contendo o ingrediente ativo (s) em uma mistura com excipientes não tóxicos farmacologicamente aceitáveis. Estes excipientes podem ser, por exemplo, diluentes inertes ou preenchedores (por exemplo, sacarose e sorbitol), agentes de deslizamento, agentes antiadesivos e lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, estearato de zinco, ácido esteárico, sílicas, óleos vegetais hidrogenados, ou talco). As composições para utilização oral também podem ser fornecidas na forma de comprimidos mastigáveis, ou como cápsulas de gelatina dura em que o ingrediente ativo é misturado com um diluente sólido inerte, ou como cápsulas de gelatina mole em que o ingrediente ativo é misturado com água ou um meio oleoso.

[00312] A composição farmacêutica a ser utilizada para administração *in vivo* deve ser tipicamente estéril. Isto pode ser conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis. Quando a composição é liofilizada, a esterilização utilizando este método pode ser realizada antes ou após liofilização e reconstituição. A composição para administração parentérica pode ser armazenada na forma liofilizada ou em solução. Além disso, as composições parentéricas são geralmente colocadas em um recipiente possuindo uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco de solução intravenosa ou frasco tendo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[00313] Uma vez que a composição farmacêutica foi formulada, ela pode ser armazenada em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, ou um pó desidratado ou liofilizado sólido. Tais formulações podem ser armazenadas quer em uma forma pronta para utilização ou em uma forma (por exemplo, liofilizada) requerendo reconstituição antes da administração.

[00314] As composições aqui também podem conter mais do que um composto ativo conforme necessário para a indicação particular a ser tratada, preferivelmente aqueles com atividades complementares que não afetam adversamente uns aos outros. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade pretendida.

#### **X. Administração**

[00315] Uma composição farmacêutica compreendendo uma Adnectina antimiostatina da presente invenção pode ser administrada a um indivíduo em risco de ou que exibe patologias como aqui descritas usando técnicas de administração convencionais incluindo oral, parentérica, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, ou supositório. De preferência, a administração das Adnectinas antimiostatina da invenção é parentérica. O termo parentérico, tal como aqui utilizado inclui a administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, retal, vaginal ou intraperitoneal. Entrega sistêmica periférica por injeção intravenosa ou intraperitoneal ou subcutânea é a preferida.

[00316] Uma dose terapeuticamente eficaz refere-se a uma dose que produz os efeitos terapêuticos para os quais é administrada. Uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica a ser utilizada terapeuticamente dependerá, por exemplo, do contexto e dos objetivos terapêuticos. Um versado na técnica apreciará que os níveis de dosagem apropriados para o tratamento irão, assim, variar dependendo, em parte, da molécula entregue, da indicação para a qual a molécula de agente de ligação está sendo utilizada, a via de administração, e o tamanho (peso corporal, superfície corporal ou tamanho do órgão) e estado (a idade e estado geral de saúde) do paciente.

[00317] Por exemplo, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente em ensaios de cultura celular ou em modelos

animais tais como camundongos, ratos, coelhos, cães, porcos, ou macacos. Um modelo animal também pode ser utilizado para determinar o intervalo de concentração apropriada e a via de administração. Tal informação pode então ser utilizada para determinar as doses úteis e vias de administração em seres humanos.

[00318] A dosagem exata será determinada à luz de fatores relacionados com o indivíduo que necessita de tratamento, e pode ser determinada utilizando técnicas padrão. A dosagem e a administração são ajustadas para proporcionar níveis suficientes do composto ativo ou para manter o efeito desejado. Os fatores que podem ser considerados incluem a severidade do estado da doença, o estado geral de saúde do indivíduo, a idade, peso e sexo do indivíduo, tempo e frequência de administração, combinação (ões) de drogas, sensibilidades de reação e, em resposta a terapia. Em geral, as Adnectinas antimiostatina da presente invenção são administrados a cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 50 mg/kg por dia, de preferência 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg por dia, mais preferivelmente de 0,01 mg/kg a cerca de 20 mg/kg por dia. Em algumas modalidades, as Adnectinas antimiostatina da presente invenção são administradas em doses semanais de cerca de 1 a 50 mg, mais preferivelmente cerca de 10-50 mg. Em outras modalidades, as Adnectinas antimiostatina da presente invenção são administradas em doses mensais de 30-200 mg, preferivelmente 50-150 mg, e mais preferivelmente 60-120 mg.

[00319] A frequência de dosagem dependerá dos parâmetros farmacocinéticos da molécula de agente de ligação na formulação utilizada. Tipicamente, uma composição é administrada até se atingir uma dosagem que alcance o efeito desejado. A composição pode, por conseguinte, ser administrada como uma dose única ou como doses múltiplas (na mesma ou em diferentes concentrações / dosagens) ao longo do tempo, ou como uma infusão contínua. Refinamento adicional

da dosagem apropriada é feito rotineiramente. As dosagens apropriadas podem ser acertadas através da utilização dos dados de dose-resposta adequados. Por exemplo, a Adnectina antimioestatina pode ser administrada diariamente (por exemplo, uma vez, duas vezes, três vezes ou quatro vezes ao dia) ou com menor frequência (por exemplo, uma vez em dias alternados, uma ou duas vezes semanalmente, ou mensalmente). Além disso, como é conhecido na técnica, os ajustes para a idade assim como o peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, tempo de administração, interação medicamentosa, e a gravidade da doença pode ser necessário, e será determinável com rotina de experimentação pelos versados na técnica. A Adnectina antimioestatina é adequadamente administrada ao paciente uma vez ou durante uma série de tratamentos.

[00320] A administração de uma Adnectina antimioestatina ou uma fusão da mesma, e um ou mais agentes terapêuticos adicionais, pode ocorrer se coadministrados ou administrados sequencialmente, tal como descrito acima para aplicações terapêuticas. Os veículos adequados farmacologicamente aceitáveis, diluentes e excipientes para a coadministração serão entendidos pelo versado na técnica como dependendo da identidade do agente terapêutico particular a ser administrado.

#### **XI. Métodos de detecção e diagnóstico**

[00321] As Adnectinas antimioestatina da invenção também são úteis em uma variedade de aplicações de diagnóstico. Por exemplo, uma Adnectina antimioestatina da invenção pode ser utilizada para diagnosticar um distúrbio ou uma doença associada a níveis elevados de mioestatina. De um modo semelhante, uma Adnectina antimioestatina pode ser utilizada em um ensaio para monitorizar os níveis de mioestatina em um indivíduo a ser tratado para uma condição associada mioestatina. As Adnectinas antimioestatina podem ser usadas com ou sem

modificação, e são rotuladas por ligação covalente ou não covalente de uma porção detectável. A porção detectável pode ser qualquer uma que seja capaz de produzir, quer direta ou indiretamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como H3, C14 ou 13, P32, S35, ou 1131; um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano.

[00322] Qualquer método conhecido na técnica para conjugar uma proteína com a porção detectável pode ser empregue, incluindo os métodos descritos por Hunter, et al., *Nature* 144:945 (1962); David, et al., *Biochemistry* 13:1014 (1974); Pain, et al., *J. Immunol. Meth.* 40:219 (1981); e Nygren, *J. Histochem. e Cytochem.* 30:407 (1982). Os métodos in vitro incluem a conjugação química bem conhecida na técnica, incluindo a química compatível com proteínas, tais como a química de aminoácidos específicos, tais como a Cys e Lys. A fim de ligar uma porção (tal como o PEG) a uma proteína da invenção, um grupo de ligação ou grupo reativo é utilizado. Grupos de ligação adequados são bem conhecidos na técnica e incluem grupos dissulfito, grupos tioéter, grupos de ácido lábeis, grupos fotolábeis, grupos peptidase lábeis e grupos esterase lábeis. Os grupos de ligação preferidos são os grupos dissulfito e grupos tioéteres, dependendo da aplicação. Para polipeptídeos sem um aminoácido Cys, um Cys pode ser manipulado em um local para permitir que a atividade da proteína exista enquanto cria um local para a conjugação.

[00323] Adnectinas antimiostatina ligadas com uma porção detectável também são úteis para imagiologia in vivo. O polipeptídeo pode ser ligado a um agente rádio-opaco ou radioisótopo, administrado a um indivíduo, de preferência na corrente sanguínea e a presença e localização da proteína marcada no indivíduo é ensaiada. Esta técnica

de imagem é útil para estágios e tratamento de doenças malignas. A proteína pode ser marcada com qualquer parte que é detectável em um indivíduo, quer por ressonância magnética nuclear, radiologia ou outros meios de detecção conhecidos na técnica.

[00324] Adnectinas antimioestatina também são úteis como agentes de purificação por afinidade. Neste processo, os polipeptídeos são imobilizados em um suporte adequado, tal como uma resina Sephadex ou papel de filtro, utilizando métodos bem conhecidos na técnica.

[00325] Adnectinas antimioestatina podem ser empregues em qualquer método de ensaio conhecido, tal como ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche diretos e indiretos e ensaios de imunoprecipitação (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

[00326] Em certos aspectos, a invenção proporciona métodos para a detecção de uma molécula alvo em uma amostra. Um método pode ainda compreender contatar a amostra com uma Adnectina antimioestatina aqui descrita, em que o referido contato é efetuado sob condições que permitem a formação do complexo Adnectina antimioestatina alvo; e detecção do referido complexo, detectando assim o referido alvo na referida amostra. A detecção pode ser realizada utilizando qualquer técnica reconhecida na área, tais como, por exemplo, radiografia, ensaio imunológico, detecção de fluorescência, espectroscopia de massa, ou ressonância de plasma de superfície. A amostra pode ser de um humano ou outro mamífero. As Adnectinas antimioestatina podem ser marcadas com uma porção de rotulagem, tal como um radical radioativo, um grupo fluorescente, um radical cromogênico, uma porção quimioluminescente, ou uma porção de hapteno. As Adnectinas antimioestatina podem ser imobilizadas em um suporte sólido.

## **XII. Kits e artigos de Fabricação**

[00327] A Adnectina antimiostatina da invenção pode ser proporcionada em um kit, uma combinação embalada de reagentes em quantidades predeterminadas com instruções para utilização nos métodos terapêuticos ou de diagnóstico da invenção.

[00328] Por exemplo, em uma modalidade da invenção, um artigo de fabricação contendo materiais úteis para o tratamento ou prevenção de distúrbios ou condições acima descritos. O artigo de fabricação compreende um recipiente e um rótulo. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição da invenção que é eficaz para prevenir ou tratar o distúrbio ou a condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco possuindo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O agente ativo na composição é uma Adnectina antimiostatina da invenção. O rótulo no, ou associado com, o recipiente indica que a composição é utilizada para tratar a condição de escolha. O artigo de fabricação pode ainda compreender um segundo recipiente compreendendo um tampão farmacologicamente aceitável, tal como solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e inserções de embalagem com instruções para utilização.

#### **Incorporação por Referência**

[00329] Todos os documentos e referências, incluindo documentos de patentes e sites, aqui descritos são incorporados individualmente em relação a este documento, na mesma medida, como se tivessem sido escritos neste documento, no todo ou em parte.

#### **EXEMPLOS**

[00330] A invenção é agora descrita por referência aos seguintes exemplos, que são apenas ilustrativos e não se destinam a limitar a presente invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em detalhe e com referência a modalidades específicas da mesma, será evidente para um versado na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e âmbito da mesma.

### **Exemplo 1 - Produção de Proteínas**

#### ***Produção de Proteínas de Alta Capacidade (HTPP)***

[00331] Aglutinantes selecionados clonados no vetor PET9d a montante de um His<sub>6</sub>tag e transformados em células de E. coli BL21 DE3 pLysS foram inoculados em 5 ml de meio LB contendo 50 µg/ml de canamicina, num formato de 24 poços e cultivadas a 37 °C durante a noite. 5 ml de meio LB fresco (50 µg/ml de canamicina) as culturas foram preparadas para a expressão induzível por aspiração de 200 µl a partir da cultura durante a noite e dispensando-as no poço apropriado. As culturas foram cultivadas a 37 °C até A<sub>600</sub> 0,6-0,9. Após indução com 1 mM de isopropil-tiogalactosídeo (IPTG), a cultura foi expressa durante 6 horas a 30 °C e coletada por centrifugação durante 10 minutos a 2750 g a 4 °C.

[00332] Os péletes de células (em formato de 24 poços) foram lisados por ressuspensão em 450 µl de tampão de lise de NaH (50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M de NaCl, 1x de Coquetel Inibidor de Prtease Complete™ - livre de EDTA (Roche), 1 mM de PMSF, 10 mM de CHAPS, 40 mM de imidazol, 1 mg/ml de lisozima, 30 µg/ml de DNAase, 2 mg/ml de aprotonina, pH 8,0) e agitados à temperatura ambiente durante 1-3 horas. Os lisados foram limpos e re-extraídos para um formato de 96 poços, por transferência para um Unifiltro GF/D de 96 poços Whatman equipado com uma placa de 96 poços, 1,2 ml de captura e filtrados por pressão positiva. Os lisados límpidos foram transferidos para uma placa quelante de 96 poços de níquel ou de

cobalto que tinha sido equilibrada com tampão de equilíbrio (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de  $\text{NaCl}$ , 40 mM de imidazol, pH 8,0) e foram incubados durante 5 min. O material não ligado foi removido por pressão positiva. A resina foi lavada duas vezes com 0,3 ml / poço com tampão de lavagem No. 1 (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de  $\text{NaCl}$ , 5 mM de CHAPS, 40 mM de imidazol, pH 8,0). Cada lavagem foi removida por pressão positiva. Antes da eluição, cada poço foi lavado com 50  $\mu\text{l}$  de tampão de eluição (PBS + 20 mM de EDTA), incubado durante 5 min, e esta lavagem foi descartada por pressão positiva. A proteína foi eluída por aplicação de mais 100  $\mu\text{l}$  de tampão de eluição a cada poço. Após uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, a placa (s) foi centrifugada durante 5 minutos a 200 g e a proteína eluída coletada em placas de captação de 96 poços contendo 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  a 0,5 M para adicionados ao fundo da placa de captação de eluição antes da eluição. Proteína eluída foi quantificada usando um ensaio de proteína total com o domínio  $^{10}\text{Fn3}$  tipo selvagem como o padrão de proteína.

### **Expressão e purificação de aglutinantes de proteína arcabouço baseadas em fibronectina insolúvel**

[00333] Para a expressão, o clone selecionado (s), seguido pelo HIS6tag, foi clonado em um vetor pET9d e foi expresso em células de E. coli BL21 DE3 pLysS. Vinte ml de uma cultura de inóculo (gerada a partir de uma única colônia chapeada) foram usados para inocular 1 litro de meio LB ou Meio de Expressão TB durante a noite (indução automática) contendo 50  $\mu\text{g/ml}$  de canamicina e 34  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol. As culturas em meio LB foram incubadas a 37 °C até  $A_{600}$  0,6-1,0, altura em que foram induzidas com 1 mM de isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) e cultivadas durante 4 horas a 30 °C. As culturas cultivadas nos meios de Expressão TB durante a noite foram incubadas a 37 °C durante 5 horas, altura em que a temperatura foi baixada para 18 °C e cultivadas durante 19 horas. As culturas foram coletadas por

centrifugação durante 30 minutos a  $\geq 10.000$  g, a 4 °C. Os péletes de células foram congelados a -80 °C. Depois de descongelar, o pélete celular foi ressuspensão em 25 ml de tampão de lise (20 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de NaCl, 1x de Coquetel Inibidor de Prtease Complete<sup>TM</sup> - livre de EDTA (Roche), pH 7,4) usando um homogeneizador Ultra-Turrax (IKA works) em gelo. A lise celular foi conseguida por homogeneização de alta pressão ( $\geq 18.000$  psi) usando um modelo MI 10S (Microfluidics). A fração insolúvel foi separada por centrifugação durante 30 minutos a  $\geq 23.300$  g, a 4 °C. O pélete insolúvel recuperado a partir da centrifugação do lisado foi lavado com 20 mM de fosfato de sódio / 500 mM de NaCl, pH 7,4. O pélete foi resolubilizado em 6 M de cloridrato de guanidina em 20 mM de fosfato de sódio / 500 mM de NaCl pH 7,4 com sonicação, seguido de incubação a 37 graus durante 1-2 horas. O pélete foi resolubilizado foi filtrado com um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  e carregado em uma coluna HisTrap equilibrada com 20 mM de fosfato de sódio / 500 mM de NaCl / tampão de guanidina a 6 M a pH 7,4. Após o carregamento, a coluna foi lavada por mais 25 volumes de coluna com o mesmo tampão. A proteína ligada foi eluída com 50 mM de imidazol em 20 mM de fosfato de sódio / 500 mM de NaCl / guanidina-HCl a 6 M a pH 7,4. A proteína purificada foi redobrada através de diálise contra 50 mM de acetato de sódio / 150 mM de NaCl, pH 4,5 ou PBS, pH 7,2.

### **Expressão e purificação de ligantes de proteína à base de arcabouço fibronectina solúveis**

[00334] Como uma alternativa à purificação de aglutinantes insolúveis, purificação de aglutinantes solúveis pode também ser utilizada. Para a expressão, o clone selecionado (s), seguido pelo HIS6tag, foram clonados em um vetor pET9d e expresso em células de E. coli BL21 DE3 pLysS. Vinte ml de uma cultura de inóculo (gerada a partir de uma única colônia banhada) foram utilizados para inocular 1

litro de meio LB ou meio de Expressão de TB durante a noite (indução automática) contendo 50 µg/ml de canamicina e 34 µg/ml de cloranfenicol. As culturas em meio LB foram incubadas a 37 °C até  $A_{600}$  0,6-1,0, seguido de indução com 1 mM de isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) e cultivadas durante 4 horas a 30 °C. As culturas cultivadas no meio de Expressão TB durante a noite foram incubadas a 37 °C durante 5 horas, após o que a temperatura foi baixada para 18 °C e foram cultivadas durante 19 horas. As culturas foram coletadas por centrifugação durante 30 minutos a  $\geq 10.000$  g, a 4 °C. Os péletes de células foram congelados a -80 °C. O pélete de células descongelado foi ressuspensão em 25 ml de tampão de lise (20 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de NaCl, 1x de Coquetel Inibidor de Prtease Complete™ - livre de EDTA (Roche), pH 7,4) usando um homogeneizador Ultra-Turrax (IKA work) sobre gelo. A lise celular foi conseguida por homogeneização de alta pressão ( $\geq 18.000$  psi) utilizando um microfluidizador Modelo M-110S (Microfluidics). A fração solúvel foi separada por centrifugação durante 30 minutos a  $\geq 23.300$  g, a 4 °C. O sobrenadante foi clarificado utilizando um filtro de 0,45 µm. O ligado clarificado é carregado em uma coluna HisTrap (GE) pré-equilibrada com 20 mM de fosfato de sódio / 500 mM de NaCl, pH 7,4. A coluna foi então lavada com 25 volumes de coluna do mesmo tampão, seguido de 20 volumes de coluna de 20 mM de fosfato de sódio / 500 mM de NaCl / 25 mM de imidazol, pH 7,4 e, em seguida, 35 volumes de coluna de 20 mM de fosfato de sódio / 500 mM de NaCl / 40 mM de imidazol, pH 7,4. A proteína foi eluída com 15 volumes de coluna de 20 mM de fosfato de sódio / 500 mM de NaCl / 500 mM de imidazol, pH 7,4, as frações foram reunidas com base na absorvância  $A_{280}$ , e dialisadas contra PBS 1x ou 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 8,5 ou 50 mM de NaOAc, 150 mM de NaCl, pH 4,5. Os precipitados foram removidos por filtração com um filtro de 0,22 µm.

### **PEGuilação Específica de Sítio de Adnectinas com polietileno**

**glicol (PEG)**

[00335] Adnectinas contendo um resíduo de cisteína foram conjugadas com PEG ou reagente de bloqueio de cisteína via química de adição de Michael entre o grupo tiol na cisteína e o grupo funcional maleimida de PEG ou n-etilmaleimida (NEM). Para PEGuilação com PEG de 2 ramificações de 40kDa (NOF Corporation, P/N GL2-400MA), o PEG foi adicionado em excesso molar à solução de proteína sob condições ligeiramente ácidas a pH neutro. A reação foi deixada prosseguir à temperatura ambiente durante 2 horas por uma noite. A reação foi então aplicada a uma coluna de permuta de íons para separar a Adnectina PEGuilada da PEG-maleimida que não reagiu e Adnectina não PEGilada. Para PEGuilação com PEG de 4 ramificações de 40 kDa (NOF, P/N GL4-400MA) ou bis-PEG de 20 kDa (NOF Corporation, P/N DE-200MA), a Adnectina foi purificada a partir de SP FF em tampão de citrato, pH 6,5. Após a redução com DTT, a amostra foi dessalinizada em uma coluna G25 no mesmo tampão para remover o DTT e reagida com 20 kDa de bis-PEG ou PEG de 4 ramificações de 40K na proporção de 2:1 (PEG:adnectina) durante 2 horas à temperatura ambiente, e a reação parou com a adição de excesso de BME. A amostra foi purificada por uma coluna Resource 15S (GE No. 17-0944-10) para remover seletivamente espécies não PEGiladas (e espécies mono-PEGiladas em caso de reação de bis-PEG de 20 kDa). Uma coluna de SEC preparativa final (GE No. 17-1071-01, Superdex200, 26/60) foi usada (se necessário) para remover espécies de elevado peso molecular e Adnectina não reativa. Para preparar uma Adnectina CYS-bloqueada, um excesso molar de 10 vezes de NEM (Pierce Chemical) foi adicionado imediatamente após a etapa acima mencionada de dessalinização G25 em tampão de citrato (pH 6,5). Isto foi incubado durante 1 hora à temperatura ambiente e a reação foi interrompida pela adição de excesso de BME. A amostra foi em seguida extensivamente dialisada

contra PBS. Os conjugados de Adnectinas purificadas foram analisados por SDS-PAGE e cromatografia de exclusão de tamanho.

***Purificação e PEGuilação de aglutinantes de proteína arcabouço baseados em fibronectina não marcada***

[00336] Aglutinantes selecionados foram clonados em um vetor pET9d sem His<sub>6</sub>tag e expressos em células de E. coli BL21 DE3 pLysS. 25 ml de uma cultura de inóculo previamente isolada a partir de uma única colônia plaqueada foram cultivados em um frasco de 125 ml até OD 600 nm atingir 1-2, usando meios de pH 6,85 + 50 µg/ml de canamicina (cloreto de amônio, ácido cítrico, citrato de amônio férrico, sulfato de magnésio, fosfato de sódio monobásico monohidratado, dextrose anidra, glicerol, Fitona peptona, extrato de levedura granulada, sulfato de canamicina, sulfato de amônio para ajuste do pH). Um fermentador de 10 L (7,5 L de partida volume de meio de batelada) foi inoculado a uma OD 600 nm final de 0,003. A cultura foi crescida durante a noite a 25 °C com agitação constante a 650 rpm e níveis de O<sub>2</sub> dissolvidos de > 30%, enquanto se mantém o pH. No dia seguinte, a temperatura foi mudada para 37 °C e a cultura foi crescida até OD 600 nm atingir 20-25. Uma vez que o diâmetro externo do alvo foi alcançado, a temperatura foi mudada para 30 °C e a cultura induzida com IPTG (concentração final: 1 mM). Um meio de alimentação (glicerol, Phytone peptona, extrato de levedura granulada, sulfato de canamicina, e ácido fosfórico para ajuste do pH) foi adicionado a uma velocidade de 40 ml de formação de meio/L de volume/h. As células foram coletadas por centrifugação a 10.000 g durante 30 min a 4 °C. Os péletes de células foram congelados a -80 °C.

[00337] A pasta celular foi descongelada em 1x PBS, a uma proporção de 10 ml de tampão / g de pasta celular. Uma vez descongelada, a amostra foi interrompida com um homogeneizador UltraTurrax (IKA works) até se tornar homogênea. A solução foi então

passada duas vezes através de um microfluidizador a 18.000 psi. A fração solúvel foi separada por centrifugação durante 30 minutos a  $\geq 10.000$  g, a 4 °C. O sobrenadante foi diluído 1:1 com acetato de sódio (pH 4,5), e clarificado com um filtro de 0,2  $\mu$ m. O lisado clarificado foi carregado em uma coluna de SP FF (SP1; GE) pré-equilibrada com 50 mM de acetato de sódio (pH 4,5). A coluna foi em seguida lavada com 2 volumes de coluna do mesmo tampão, seguido de 8 volumes de coluna de 50 mM de acetato de sódio / 350 mM de NaCl, pH 4,5. A proteína foi eluída com 50 mM de acetato de sódio / 700 mM de NaCl, pH 4,5. Eluições foram reunidas com base na absorvância a  $A_{280}$ .

[00338] A eluição SP1 foi diluída 1:5 com 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,7) e carregada em uma coluna de SP FF (SP2) pré-equilibrada com 20 mM de fosfato de sódio / 100 mM de NaCl, pH 6,7. A coluna foi em seguida lavada com 2 volumes de coluna do mesmo tampão. A proteína foi eluída a partir da coluna com 20 mM de fosfato de sódio / 0,5 M de NaCl, pH 6,7. Eluições foram reunidas com base na absorvância a  $A_{280}$ .

[00339] A eluição SP2 foi diluída a 100 mM de NaCl com 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,7) e carregada em uma coluna Q FF (GE) pré-equilibrada com 20 mM de fosfato de sódio / 100 mM de NaCl, pH 6,7. O pico FT (contendo produto) foi recolhido. A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio até o pico FT retornar à linha de base.

[00340] Adnectinas contendo um resíduo de cisteína engenheirado foram conjugadas com PEG via adição química de Michael entre o grupo tiol na cisteína e o grupo funcional maleimida do reagente PEG. A fração Q FT foi PEGuilada com PEG ramificado de 40 kDa em uma razão molar de 2:1 de PEG para proteínas. A amostra foi incubada durante a noite à temperatura ambiente. A reação de PEGuilação foi diluída com 2 partes de 50 mM de acetato de sódio (pH 4,5) e carregada em uma coluna de SP FF (GE) pré-equilibrada com 50 mM de acetato

de sódio (pH 4,5). A coluna foi lavada com dois volumes de coluna do mesmo tampão. Proteína PEGuilada foi eluída a partir da coluna com 50 mM de acetato de sódio / 200 mM de NaCl, pH 4,5). Eluições foram reunidas com base na absorvância a  $A_{280}$ . Proteína PEGuilada foi concentrada utilizando uma membrana de 30kDa da Millipore Biomax. A amostra foi filtrada através de um filtro de 0,22  $\mu$ m e armazenada a, por exemplo, 4 °C, -20 °C ou -80 °C.

***Expressão transitória e purificação de proteínas arcabouço ligantes à base de fibronectina Fc-formatados***

[00341] Para a geração de DNA, os candidatos selecionados foram clonados em um PDV-16 a partir dos quais o plasmídeo a partir de células de E. coli Top 10 foram transformados. PDV-16 é uma versão modificada de pTT5 (Yves Durocher, NRC Canadá), em que a sequência de codificação de IgG1-Fc humano foi introduzida, precedida pela sequência de sinal e sítios de restrição foram incluídos para permitir a inserção de sequências de codificação de Adnectina em qualquer um dos terminais de Fc. As células transformadas foram expandidas através da inoculação de 1 L de caldo de Luria contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina e incubadas em um incubador rotativo a 225 rpm durante 18 horas a 37 °C. Os péletes bacterianos foram coletados por centrifugação a  $>10000g$  durante 30 minutos a 4 °C. DNA de plasmídeo purificado foi isolado utilizando um kit Qiagen Plasmid Mega Plus (QIAGEN) como descrito no protocolo do fabricante. O DNA purificado foi quantificado utilizando a absorvância a 260 nm e congelado a -80 °C antes de usar.

[00342] Células HEK 293-EBNA 1 (clone 6E) (Yves Durocher, NRC Canadá) foram expandidas para  $2 \times 10^6$  células / ml em 2 L de meios F17 em um saco de de 10 L da GE Healthcare Wave a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, e misturadas agitando com um ângulo de 8 graus a 18 rpm.

[00343] DNA foi preparado para transfecção como se segue: Meios F17 foram aquecidos a 37 °C. DNA e um reagente de transfecção de

PEI foram descongelados em uma capa biosegurança estéril. DNA (2,25 mg) foi adicionado a 100 ml de meio F17 aquecido em um frasco de cultura de polipropileno estéril e misturado suavemente, através de agitação. Em um frasco separado, 6,75 mg de PEI (1 mg/ml) foi combinado com 100 ml de meios F17 pré-aquecido e misturado suavemente, através de agitação. Os frascos foram deixados a descansar durante 5 minutos antes da combinação dos conteúdos por adição da solução de PEI ao frasco contendo o DNA e misturando suavemente por redemoinho.

[00344] Os conteúdos do frasco contendo a mistura de DNA: PEI foram adicionados ao saco contendo wave as células HEK 293-6E após incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos na capa de biossegurança. O saco contendo as células HEK 293-6E transfectadas foi incubado durante vinte e quatro horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, e misturado por um ângulo de balanço em 8 graus a 18 RPM. Após 24 horas, 100 ml de 20% de triptona de N1 filtrado estéril (Organotechnie, Canadá) dissolvido em meio F17 foi assepticamente adicionado à cultura. As células e os meios foram colhidos após um período adicional de 72 horas de incubação, tal como descrito acima. Alternativamente, a expressão de HEK transiente em frascos de agitação (0,5 L meio em um frasco de 2 L) pode ser realizada com uma relação DNA:PEI de 1:2. As células foram separadas do meio condicionado por centrifugação a 6000g durante 30 minutos a 4 °C. O meio condicionado foi retido, filtrado através de um filtro de 0,2 µM, e armazenado a 4 °C.

[00345] O meio condicionado foi aplicado a uma coluna de cromatografia de 10 ml contendo resina Sure MabSelect GE pré-equilibrada com PBS a uma taxa de 5 ml / minuto. Depois de colocar os meios condicionados filtrados, a coluna foi lavada com pelo menos 100 ml de PBS à temperatura ambiente. O produto purificado foi eluído a partir da coluna com a aplicação de 100 mM de glicina / 100 mM de

NaCl, pH 3,0. As frações foram neutralizadas em pH, quer por coleta em tubos contendo 1/6 de volume de 1M de Tris, pH 8, ou através do agrupamento de acordo com absorvância A280, seguido pela adição de 1 M de Tris pH 8 a 100 mm. Se o teor de espécies de elevado peso molecular é superior a 5% após eluição da Proteína A, em seguida, a amostra é ainda mais purificada por uma coluna 200 (26/60) Superdex (GE Healthcare) em PBS. As frações SEC contendo monômeros são reunidas e concentradas. A proteína A ou grupo SEC resultante foi exaustivamente dialisada contra PBS a 4 °C, e esterilizada por filtração usando um filtro de corte de 0,22 µm antes de congelar a -80 °C.

***Fabricação em Massa: Expressão de Mamífero e Recuperação Primária: Sistema UCOE CHO***

[00346] Um Banco de Célula de Pesquisa (RCB) de mamíferos foi criado por transfecção de fusões Adnectina antimioestatina-Fc clonadas no vetor pUCOE contendo o Elemento de Abertura de Cromatina Ubíquo (UCOE) [vetor UCOE modificado da MiUipore] em células CHO-S. Um RCB foi estabelecido por expansão de células em meio de seleção (0,04% (v/v), L-Glutamina (Invitrogen) e 0,01 (v/v) Suplemento HT (Invitrogen) em meio CHO CD (Invitrogen)), contendo 12,5 µg/ml de puromicina. Número de células de baixa passagem foi assepticamente isolado através de centrifugação, ressuspensas em meio de banco (0,04% (v/v), L-glutamina (Invitrogen), 0,01% (v/v) Suplemento HT (Invitrogen) e 7,5% (v/v) de DMSO em meio CHO CD (Invitrogen)) a uma concentração final de  $1 \times 10^7$  células / mL. Estas células foram inicialmente congeladas em um banho de álcool isopropílico a 70% a -80 °C durante a noite e, em seguida, transferidas para nitrogênio líquido durante a armazenagem a longo prazo no dia seguinte.

[00347] A cultura celular foi iniciada por descongelamento de um frasco de RCB em 25 mL de meio de seleção contendo 12,5 µg/ml de puromicina e expandindo a cultura no mesmo meio. As células foram

deixadas atingir uma concentração entre  $1-2 \times 10^6$  células / ml, antes de serem divididas de volta para  $0,2 \times 10^6$  células / mL. As células foram geralmente mantidas entre 2-4 semanas antes de semear um biorreator. A expansão da cultura foi passada por um tempo final e deixada crescer até o ponto em que um biorreator de 15 L contendo 8 L de meios de produção (meios CD CHO Invitrogen contendo 0,01% (v/v) Suplemento HT (Invitrogen), 0,04% (v/v) Glutamax (Gibco), e 0,005% (v/v) de Pluronic F-68 (Gibco)) pudesse ser semeado a uma densidade final de  $0,2 \times 10^6$  células / mL. O biorreator cultura foi monitorizado diariamente para VCD (densidade de células viáveis), percentagem de viabilidade, pH, e concentração de glicose. A cultura do biorreator foi alimentada nos dias 3 e 6, com um volume total de 10% de adição de bolus de meio de alimentação. A cultura foi coletada entre o dia 7 e o dia 9, com uma viabilidade percentual  $> 70\%$ . Durante a cultura, a cultura do biorreator foi controlada a um pH de 7,1, temperatura de  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , %DO2 de 40%, e uma constante de 100 RPM.

[00348] No dia da colheita, as culturas de biorreator foram passadas diretamente através de um filtro de profundidade  $6.0 / 3.0\ \mu\text{m}$  seguido de uma filtração estéril de  $0,8 / 0,2\ \mu\text{m}$  em um saco estéril. Cultura estéril clarificada foi armazenada durante a noite a  $2-8\text{ }^\circ\text{C}$ . A cultura clarificada foi então concentrada através de flatsheet TFF utilizando uma membrana de 30.000 kDa. A concentração aproximada foi 6x, dependendo da titulação coletada. Sobrenadante concentrado foi depois filtrado para esterilização em garrafas de PETG e ou processados diretamente ou guardados a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### ***Purificação de Fusão de Antimiostatina-Adnectina-Fc***

[00349] Sobrenadante da cultura coletado (puro ou concentrado) é carregado em uma coluna de Proteína A MabSelect previamente equilibrada com PBS. A coluna é lavada com 5CV de 50 mM de Tris pH 8,0, 1 M de ureia, 10% de PG. Fusão de Adnectina-Fc é eluída com 100

mM de glicina pH 3,3, coletando o pico em um recipiente que é previamente carregado com 1CV de 200 mM de Acetato de sódio de pH 4,5. Eluição de pico é baseada na absorvância a A280.

[00350] A eluição da Proteína A é diluída a pH 3,0 com a adição de 2 M de ácido cítrico e deixada à temperatura ambiente durante 1 hora, para inativação viral. A amostra é então diluída com 200 mM de fosfato de sódio tribásico até pH 4,5 ser atingido. Se necessário, a solução é ainda diluída com água para baixar a condutividade abaixo de 10 ms/cm.

[00351] A eluição da proteína A diluída é passada sobre um Tosoh Q 600C AR (Tosoh Bioscience), previamente condicionado com 50 mM de acetato de sódio pH 4,5, em um modo de captura negativa. O pico de capacidade de vazão é recoletado, com base na absorvância a A280. A coluna é lavada com 50 mM de acetato de sódio e removida com NaOH a 0,2N.

[00352] A capacidade de vazão Q 600C AR é formulada por meio da filtração de fluxo tangencial utilizando uma membrana de fibra oca 30K NMWCO (GE), com mistura muito suave do retido. A fusão de Adnectina-Fc é diafiltrada em 25 mM de fosfato de sódio, 150 mM de Trealose pH 7,0 durante 6 diavolumes, e depois concentrada para uma concentração de proteína alvo.

### **Exemplo 2 - Avaliação Biofísica de Proteínas Antimiostatina**

[00353] **Cromatografia de exclusão de tamanho:** Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) padrão foi realizada em Adnectinas candidatas resultantes do processo de meia escala. SEC de material de meia escala foi realizado utilizando uma coluna Superdex 200 10/30 ou sobre uma coluna Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) em um sistema HPLC 1100 ou 1200 da Agilent com detecção UV a A214 nm e A280 nm e com detecção de fluorescência (excitação 280 nm, emissão 350 nm). Um tampão de 100 mM de sulfato de sódio / 100 mM de fosfato de sódio

/ 150 mM de cloreto de sódio, pH 6,8 foi utilizado a uma taxa de fluxo apropriada para a coluna SEC empregue. Padrões de filtração em gel (BioRad Laboratories, Hercules, CA) foram utilizados para a calibração de peso molecular. Os resultados da SEC sobre Adnectinas purificadas de meia escala mostraram Adnectina predominantemente monoméricas e eluição no intervalo aproximado de 10 kDa vs. padrões de Filtração em Gel globulares (BioRad), conforme mostrado nas tabelas 9 e 10.

[00354] **Termoestabilidade:** Análise de Fluorescência de Varredura Térmica (TSF) de Adnectinas de HTPP foi realizada para selecioná-las para estabilidade térmica relativa. As amostras foram normalizadas para 0,2 mg/ml em PBS. 1 µl de corante laranja Sypro diluído 1:40 com PBS foi adicionado a 25 µl de cada amostra e a placa foi selada com um selo adesivo de microplaca de 96 poços claro. As amostras foram varridas utilizando uma máquina de RT-PCR BioRad aumentando a temperatura de 25 °C-95 °C, a uma taxa de 2 graus por minuto. Os dados foram analisados utilizando o software 2.0 gerenciador CFX BioRad. Os valores obtidos com GST foram mostrados correlacionando-se bem com os valores de T<sub>m</sub> obtidos por DSC em uma faixa de fusão de 40 °C a 70 °C. Esta é considerada a faixa de trabalho aceitável para esta técnica. Um resultado de ND ("Sem Dados") é obtido quando a inclinação da curva de transição é demasiada pequena para permitir que o seu pico derivado (a taxa de variação na fluorescência com o tempo) deve ser distinguido do ruído. Um resultado "ND" não pode ser interpretado como uma indicação de estabilidade térmica. Análise de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) de HTPP'd dialisado e Adnectinas de meia escala foi realizada para determinar os seus respectivos T<sub>m</sub>,S. Um solução de 0,5 mg/ml foi digitalizada em um calorímetro de Varredura Diferencial Capilar de VP (Microcal GE) pela elevação da temperatura de 15 °C a 110 °C, a uma taxa de 1 grau por minuto sob 70 psi de pressão. Os dados foram analisados vs. uma

execução de controle do tampão adequado usando um melhor ajuste usando Origin Software (OriginLab Corp). Os resultados das análises de DSC e TSF estão resumidos nas Tabelas 8-10. Como mostrado nas Tabelas 8-10, muitos dos clones exibiram temperaturas não desdobradas superiores a 60 °C, indicando uma estrutura altamente e biofisicamente estável apropriada para a formulação farmacêutica. Adnectinas eram geralmente tolerantes com PEGuilação ou formatação de Fc sem perda aparente de estabilidade. Em alguns casos, estes formatos proporcionaram uma estabilidade melhorada. Por exemplo, 3116\_A07 como uma Adnectina não modificada tem uma Tm com GST de 60 °C, mas quando PEGuilado (ATI-1377) a Tm por DSC foi 68°C, e em um formato de Fc-X (PRD-1286) a Tm por DSC foi 66 °C.

### **Exemplo 3 - Ensaio de Luciferase Baseado em Célula**

[00355] Um plasmídeo repórter de luciferase, Elemento Responsivo a Activina (ARE)-luc, foi gerado por ligação de nove repetições do ARE em tandem para a repórter luciferase de vagalume. O plasmídeo foi transfectado transientemente em células HepG2. O plasmídeo pGL4.74 [hRluc/TK] foi cotransfectada para normalizar para a eficiência de transfecção. 10.000 células foram plaqueadas por cavidade de uma placa de 96 poços. Quando uma proteína, tal como a miostatina, activina, ou BMP-11, é adicionada às células e se liga ao seu receptor cognato, a SMAD de sinalização jusante é disparada, levando a ligação de um complexo SMAD fosforilado para o ARE. A quantidade de, por exemplo, a miostatina, exposto às células é diretamente proporcional à quantidade de proteína luciferase produzida e, por conseguinte, a atividade da luciferase medida. Quando um antagonista da miostatina (por exemplo, uma Adnectina antimioestatina) é adicionado em simultâneo com a miostatina para as células, a ativação do ARE diminui, conduzindo a uma produção e a atividade de luciferase diminuída.

[00356] Nesta experiência, (1) Adnectina antimioestatina e miostatina,

(2) Adnectina antimioestatina e activina A, ou (3) Adnectina antimioestatina e BMP-11 foram pré-incubados previamente à adição às células. A miostatina (R&D Systems) foi utilizada a 10-500 pM, ativina A (R&D Systems) a 10-500 pM, e BMP-11 (R&D Systems) a 10-500 pM. Após incubação durante a noite com várias combinações destes, as células foram lisadas e a atividade da luciferase (luminescência) medidas com o sistema ensaio de luciferase Dual-Glo® (En Vision). O IC50 é definido como a concentração de Adnectina necessária para alcançar 50% de inibição da atividade da luciferase induzida por miostatina ARE.

[00357] Como mostrado nas Tabelas 8-10, Adnectinas antimioestatina inibiram os aumentos mediados por atividade de miostatina em repórter ARE-luc.

#### **Exemplo 4 - Ensaio de Ligação de HTRF**

[00358] Um ensaio de HTRF foi usado para medir as afinidades de ligação das Adnectinas antimioestatina a miostatina. O ensaio foi um ensaio HTRF competitivo usando etiqueta Eu-W1024 como um fluoróforo doador e Alexa Fluor® 647 como um fluoróforo aceitador. O biotinizado Adnectina 1889E01 e Alexa Fluor® 647 rotulado rhActRIIb-Fc pode ligar miostatina simultaneamente em dois sítios de ligação distintos. A Streptavidina rotulada com EU-W1024 é usada para ligar 1889E01 biotinizado. Os dois fluoróforos, Eu-W1024 e Alexa Fluor® 647, estão reunidos pela formação de um complexo 1889E01 / miostatina / ActRIIb-Fc, e o sinal de HTRF pode ser lida em um leitor de placas En Vision (Perkin Elmer) utilizando um protocolo de HTRF. Na presença de uma Adnectina competitiva, o sinal de HTRF diminui. IC50s são apresentados nas Tabelas 8-10.

**Tabela 8:** Caracterização biofísica, ensaio de repórter ARE-luciferase, e resultados de ensaio de ligação de HTRF para monoAdnectinas antimioestatina.

ID	Tm – TSF	Tm-DSC	Ensaio ARE-luciferase			HTRF
			Mio IC50 (nM)	BMP-11 IC50 (nM)	Activina A IC50 (nM)	Mio IC50 (nM)

1979_B06		48	0,11	3,3	194	ND
2062_G02		48	205	1500	>1500	ND
2522_C09	40		0,06	1,6	1000	ND
2523_G06	49	49	4,2	46	>2000	ND
2524_C11	ND	55	0,1	0,89	765	ND
2524_D09	54	49	0,06	0,55	84	ND
2524_E10	ND		0,09	5,6	>1000	ND
2524_H05	40		0,09	7,3	>1000	ND
2524_H11	49		0,03	6,2	>1000	ND
2525_B01	ND		0,11	3,2	73	ND
2525_D02	58	55	0,05	1,1	345	ND
2525_D05	ND	69	0,11	3,9	>1000	ND
2525_F07	46		0,13	3,4	>1000	ND
2987_A06		50	0,10	23	283	ND
2987_B04		48	0,12	3,3	239	ND
2987_B09		52	0,01	0,92	172	ND
2987_C02		50	0,06	7,1	464	ND
2987_D05		49	0,11	2,4	2000	ND
2987_E03		51	0,10	2,3	224	ND
2987_E08		52	0,05	2,8	352	ND
2987_F01		49	0,05	6,5	594	ND
2987_F06		52	0,08	20	538	ND
2987_G04		49	0,09	3,3	171	ND
2987_G09		54	0,05	0,91	>2000	ND
2987_H02		51	0,05	11	794	ND
2987_H07		57	0,02	5,5	>400	ND
3006_A10	62		0,08	2,0	>2000	0,15
3007_B08	57		0,06	0,23	423	0,14
3007_C09	63		0,04	0,89	417	0,14
3007_C10	66		0,03	1,0	>2000	0,14
3008_A03	59		0,11	22,6	>2000	0,22
3008_B08	57		0,35	9,3	254	0,37
3008_D04	56		0,09	1,2	720	0,14
3008_F01	63		0,08	0,12	>2000	0,21
3008_G01	57		0,03	0,31	>2000	0,11
3008_G03	58		0,09	1,3	>2000	0,13
3115_D04	64		0,16	3,6	>1000	0,20
3115_E06	62		0,07	2,0	>1000	0,14
3116_A06	64		0,14	13	>1000	0,15
3116_A07	60		0,04	0,5	>1000	0,11
3116_C01	60		0,10	6,7	1000	0,35
3116_C06	61		0,14	8,9	>1000	0,18
3116_H06	60		0,10	1,6	>1000	0,13

3146_A08	69		0,70	48	>1000	0,26
ATI-1267		60	0,06	0,50	644	0,12
ATI-1275		53	0,03	0,14	19	0,19
ATI-1277		Nenhuma transição	0,14	1,18	2000	0,38
ATI-1340		54	0,05	4,87	324	0,16

**Tabela 9:** Caracterização Biofísica, ensaio de repórter ARE-luciferase, e resultados de ensaio de ligação de HTRF para Adnectinas antimiostatina PEGuiladas.

ID	Tm – TSF	Tm- DSC	% de monô- mero (SEC)	Ensaio ARE-luciferase			HTRF
				Mio IC50 (nM)	BMP-11 IC50 (nm)	Activina A IC50 (nM)	Mio IC50 (nM)
ATI-1106				177	1414	>2000	
ATI-1107		63	98	19	888	>2000	ND
ATI-1266		60	97,8	0,12	0,89	2000	0,21
ATI-1276		56	94,6	0,08	0,15	110	0,28
ATI-1278		46	93,7	0,27	1,1	>2000	0,54
ATI-1338		59		0,28	5,8	>1000	0,24
ATI-1339		61		0,28	6,0	>1000	0,28
ATI-1341		53		0,03	0,14	14	0,13
ATI-1359		57	96,5	0,26	3,1	>1000	0,36
ATI-1375		67	>99	0,17	1,6	>1000	0,76
ATI-1376		70	>99	0,03	0,83	>1000	0,32
ATI-1377		68	>99	0,05	0,78	>1000	0,15
ATI-1378		74	>99	0,29	5,4	>1000	1,29
ATI-1379		69	>99	0,10	4,3	>1000	0,28

[00359]

**Tabela 10:** Caracterização Biofísica, ensaio de repórter ARE-luciferase, e resultados de ensaio de ligação de HTRF para Adnectinas antimiostatina fundidas com Fc.

ID	Tm – TSF	Tm- DSC	% de Mo- nômero (SEC)	Ensaio ARE-luciferase			HTRF
				Mio IC50 (nM)	BMP-11 IC50 (nm)	Activina A IC50 (nM)	Mio IC50 (nM)
PRD-932				0,24	ND	ND	ND
PRD-1171				0,08	0,20	19	0,14
PRD-1173				0,02	0,10	6	0,12
PRD-1174		Tm1 61 Tm2 67 Tm3 83		0,04	0,10	4	0,09
PRD-1175				0,10	0,28	19	0,15
PRD-1177				0,16	0,28	21	0,64
PRD-1178		Tm1 60 Tm2 69 Tm3 84		0,08	0,25	16	0,27
PRD-1180		Tm1 68 Tm2 83		0,07	0,11	14	0,13
PRD-1284				0,02	0,04	44	0,62
PRD-1285		Tm1 67 Tm2 68 Tm3 80	97	0,05	0,03	216	0,49
PRD-1286		Tm1 66 Tm2 68 Tm3 81	99	0,10	0,11	94	0,73
PRD-1287				0,30	0,80	>1000	2,70
PRD-1288		Tm1 65 Tm2 69 Tm3 81	93	0,08	0,10	>1000	0,47

PRD-1301				0,06	0,06	15	0,07
PRD-1302				0,03	0,02	14	0,12
PRD-1303				0,02	0,03	314	0,11
PRD-1304				0,05	0,07	45	0,24
PRD-1305				0,06	0,07	113	0,10
PRD-1471		Tm1 62 Tm2 68 Tm3 81	99	0,16	0,16	60	0,47
PRD-1472		Tm1 62 Tm2 69 Tm3 80	100	0,07	0,05	1000	0,41
PRD-1473		Tm1 63 Tm2 69 Tm3 81	100	0,07	0,06	125	0,73
PRD-1474		Tm1 63 Tm2 69 Tm3 81	100	0,08	0,09	>1000	0,45

**Exemplo 5- Inibição mediada por Adnectina antimioestatina de fosforilação de SMAD2 induzida por mioestatina**

[00360] Células de rhabdomyosarcoma RH41 humano (DSMZ, Braunschweig, Alemanha) foram utilizadas para a análise de resposta de inibição 12-, 2-, e 4 pontos descrita abaixo. As células foram removidas do meio de cultura e lavadas para remover o soro e desativadas em meio de ensaio contendo BSA durante 4 horas. As células foram levantadas do frasco usando verseno e transferidas para placas de polipropileno de fundo em V de 96 poços a  $5 \times 10^5$  células / poço. Para a resposta de inibição de 12 pontos, 100 pM de mioestatina recombinante (R&D Systems), pré-incubados durante 1 hora com uma faixa de concentrações de diluição de 5 vezes de Adnectinas a partir de 1000 nM (ou seja, 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM, 0,064 nM, 0,0128 nM, 0,00256 nM, 0,000512 nM, 0,000102 nM, 0,0000204 nM), foi adicionado às células. Para a inibição de resposta de 4 pontos, 100 pM de mioestatina, pré-incubados durante 1 hora com uma faixa de concentração de Adnectinas (30 nM, 3 nM, 0,1 nM ou 0,001 nM), foi adicionado às células. Para a resposta de inibição de 2 pontos, 100 pM de mioestatina, pré-incubados durante 1 hora com um intervalo de concentração de Adnectinas (10 mM ou 0,5 nM), foi adicionado às células. As células foram tratadas com a mistura mioestatina - Adnectina durante 1 hora a 37 °C para induzir a fosforilação de SMAD2 (pSMAD2). A estimulação foi interrompida colocando as

células em gelo e adicionando PBS gelado. As células foram sedimentadas e lisadas de acordo com protocolos padrão e fosforilação de SMAD2 detectada utilizando um ensaio ELISA (Cell Signaling Technologies). A inibição conseguida pela faixa de concentrações de Adnectinas foi representada graficamente utilizando o Software GraphPad Prism e normalizando pontos de dados para controles que deram 100% e 0% de inibição. O IC50 é definido como a concentração de Adnectina necessária para alcançar 50% de inibição da fosforilação de SMAD2 induzida por miostatina. Os dados apresentados na Tabela 11 indicam que Adnectinas derivadas de otimização de afinidade de clones parentais 1979\_B06 e 2062\_G02 tanto de forma potente quanto completamente inibiram fosforilação de pSMAD induzida por miostatina e os valores de IC50 demonstrados variando de 0,78 nM a 0,06 nM. Isto representa uma melhoria de 16-75 vezes maior do que em valores de IC50 nos clones parentais 1979\_B06 (IC50 = 12,8 nM) e 2062\_G02 (IC50 = 59,1 nM).

**Tabela 11.** Inibição da fosforilação de SMAD2 (pSMAD2) por Adnectinas antimioostatina

Ensaio de pSmad2			
ID	Mio IC50 (nM) 12-pontos	Mio IC50 (nM) 4-pontos	Mio % de Inibição a 10 nM
1979_B06(aka ATI-1133)	12,8+2,4		
2062_G02(aka ATI-1134)	59,1+16,2		
2522_C09	0,13		
2523_G06	0,78		
2524_C11	0,14		
2524_D09	0,11		
2524_E10	0,13		
2524_H05	0,13		
2524_H11	0,11		
2525_B01	0,14		
2525_D02	0,36		
2525_D05	0,20		
2525_F07	0,27		
3006_A10			51
3007_B08			97
3007_C09			80
3007_C10			76
3008_A03			87
3008_B08			90

3008_D04			92
3008_F01			86
3008_G01			98
3008_G03			91
3115_D04		0,06	
3115_E06		0,06	
3116_A06		0,27	
3116_A07		0,06	
3116_C01		0,26	
3116_C06		0,73	
3116_H06		0,06	
3146_A08		0,78	

**Exemplo 6 - Medições de afinidade de SPR para Adnectinas antimioestatina - Cinéticas de ligação de Adnectinas usando o formato de SPR A**

[00361] Anticorpo Fc anti-humano (Biacore / GE) foi imobilizado em um chip CM5 Biacore através acoplamento NHS / EDC de acordo com as instruções do fabricante. ActRIIb-Fc (R&D Systems) foi capturado em ambas as células de referência e de fluxo ativo, seguido pela captura de miostatina humana (R&D Systems), BMP-11 humano (GDF-11; R&D Systems), ou Activina A humana (R&D Systems) em células de fluxo ativos apenas (cada uma solubilizada de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante e diluída em tampão de operação de HBSP). A faixa de concentração de Adnectina antimioestatina foi aplicada em todas as células de fluxo em tampão de execução HBSP. A regeneração da superfície do chip entre os ciclos foi realizada com dois pulsos de 30 segundos de  $MgCl_2$  a 3M. Vestígios de cinéticas de sensorgramas subtraído de referência foram ajustados para um modelo de ligação 1:1 utilizando o software BIAevaluation. Um resumo dos dados de cinética da Biacore é mostrado na Tabela 12. Os dados apresentados na Tabela 12 indicam que Adnectinas progênie otimizadas se ligam à miostatina firmemente, com KDs, na faixa de 0,06-1,47 nM, em comparação com Adnectinas parentais 1979\_B06 e 2062\_G02, que exibiram KDs de 29 e 49 nM, respectivamente.

[00362] Após a PEGuilação, existe alguma perda de afinidade de miostatina, com KDs variando 0,76-14,4 nM, embora não haja efeito da

PEGuilação sobre a potência no ensaio de ARE-luciferase (vide Tabelas 8 e 9).

[00363] Seletividade de Adnectina sobre BMP-11 varia de totalmente não seletiva até 17 vezes, enquanto que a ligação a activina ou é extremamente fraca ou inexistente, o que sugere alta seletividade sobre activina.

***Cinéticas de ligação de Adnectina usando formato de SPR B (útil para Adnectinas com formato de Fc)***

[00364] Miostatina humana (R&D Systems), BMP-11 humano (GDF-11; R&D Systems), ou Activina A humana (R&D Systems) foram solubilizados acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante e imobilizados em um chip CM5 da Biacore em 1-10 mg/ml em tampão de acetato (pH 4.0 ou 4.5) usando o padrão de acoplamento NHS / EDC. Uma faixa de concentrações de Adnectinas antimiostatina foi aplicada em tampão de execução de HBSP. A regeneração da superfície do chip entre os ciclos foi realizada com 60 segundos de 10-50 mM de NaOH. Vestígios de cinéticas de sensorgramas subtraído de referência foram ajustados a um modelo de ligação 1:1 utilizando o software BIAevaluation. Para Adnectinas com formato de Fc, cinética de interação são acionadas por avidéz de Fc bivalente e miostatina dimérica mesmo a baixa densidade de imobilização. Um resumo dos dados de cinética de Biacore é mostrado na Tabela 12. Os dados mostrados na Tabela 12 indicam que algumas das Adnectinas executadas neste formato SPR se ligam à miostatina e BMP-11 e também activina com afinidades semelhantes. A seletividade substancial sobre activina no ensaio ARE-luciferase, no entanto, sugere que a afinidade para activina pode ser acentuada artificialmente neste formato de ensaio de SPR.

**Tabela 12.** Sumário de dados de cinética de SPR para adectinas

antimioestatina. Formatos A e B são descritos no Exemplo 6.

ID	Mio KD (nM)	BMP-11 KD (nM)	Activina A KD (nM)	Formato
1979_B06 (aka ATI-1133)	29	489	sem ligação	A, 25C
2062_G02 (aka ATI-1134)	48,8	697	sem ligação	A, 25C
2522_C09	0,51	0,45	sem ligação / fraca	A, 25C
2523_G06	1,465	10,65	sem ligação	A, 25C
2524_C11	0,62	0,67	sem ligação	A, 25C
2524_D09	0,64	0,81	ligação fraca	A, 25C
2524_E10	1,34	1,42	sem ligação	A, 25C
2524_H05	0,88	0,87	ligação fraca	A, 25C
2524_H11	1,12	1,22	sem ligação	A, 25C
2525_B01	1,29	1,58	ligação fraca	A, 25C
2525_D02	0,24	0,30	sem ligação / fraca	A, 25C
2525_D05	1,28	1,99	sem ligação	A, 25C
2525_F07	0,79	0,97	sem ligação / fraca	A, 25C
2987_H07	0,99	2,25	ligação fraca	A, 25C
ATI-1267	0,057	0,065	ligação fraca	A, 25C
ATI-1275	0,15	0,15	ligação fraca	A, 25C
ATI-1277	0,16	0,14	ligação fraca	A, 25C
ATI-1107	128	~300	sem ligação	A, 25C
ATI-1266	0,76	2,57	ligação fraca	A, 25C
ATI-1276	4,18	8,8	sem ligação	A, 25C
ATI-1278	6,04	3,3	sem ligação	A, 25C
ATI-1338	1,9	3,8	4,6	B, 37C
ATI-1339	3,6	6,9	6,5	B, 37C
ATI-1359	7,9	35,45	ligação fraca	A, 25C
ATI-1375	12,6	33,2	ligação fraca	A, 25C
ATI-1376	8,21	13,4	ligação fraca	A, 25C
ATI-1377	8,21	14,2	ligação fraca	A, 25C
ATI-1378	14,4	59,6	ligação fraca	A, 25C
ATI-1379	9,5	21,6	ligação fraca	A, 25C
PRD-932	1,43	ND	ND	B, 25C
PRD-1474 (aka ATI-1465)	0,59	ND	ND	B, 37C

### **Exemplo 7- Solução de Afinidade de Fase para Adnectinas Antimioestatina**

[00365] A afinidade de solução de PRD-1474, uma Adnectina antimioestatina fundida com Fc, para a mioestatina foi medida utilizando um Ensaio de Exclusão Cinética (KinExA). Titulações em quadruplicado de PRD-1474 foram realizadas com a mioestatina, a uma concentração de monômero de 2 nM (n = 2), 1 nM (n = 1), e 0,7 nM (n = 1). A concentração relativa de mioestatina não ligada foi medida por captura sobre uma matriz sólida ATI-1310 (acoplado a esferas de poliacrilamida através de uma cisteína livre construída) seguido por detecção com um construto marcado com fluorescência do co-receptor de mioestatina, ActRIIB-Ig, que pode ligar-se a mioestatina simultaneamente com a

Adnectina. ATI-1310 é uma Adnectina relacionada que compete com PRD-1474 para a ligação a miostatina e permite a captura de miostatina não ligada. A análise global de  $K_D$  apresentada na Tabela 13 dá um  $K_D$  de 170 pM com um intervalo de confiança de 95% de 330-60 pM. As afinidades de PRD-1177 e ATI-1338 também foram medidas utilizando o mesmo formato de ensaio. Titulações em triplicado de PRD-1177 foram realizadas com a miostatina, a uma concentração de monômero de 1 nM (n = 2) e 0,8 nM (n = 1). Titulações em triplicado de ATI-1338 foram realizadas com a miostatina, a uma concentração de monômero de 5 nM (n = 1), 1,6 nM (n = 1), e 1,4 nM (n = 1). Estas análises indicam que PRD-1177 liga miostatina com um valor  $K_D$  global de 250 pM e um intervalo de confiança de 95% dos 340-130 pM (Tabela 13). ATI-1338 liga miostatina com um valor  $K_D$  global de 850 pM e um intervalo de confiança de 95% dos 1400-330 pM.

**Tabela 13.** Medições de afinidade de fase de solução de KinExA para a miostatina.

Adnectina	Kd	95% de intervalo de confiança:	
		Kd alto	Kd baixo
PRD-1474	170 pM	330 pM	60 pM
PRD-1177	250 pM	340 pM	130 pM
ATI-1338	850 pM	1400 pM	330 pM

### **Exemplo 8 - Análise mutacional de 3116\_A06**

[00366] A fim de compreender a tolerância relativa de posições de alça para mutação, dois estudos semelhantes, mas separados foram realizados. O primeiro era uma varredura de alanina tradicional, em que a ligação e a eficácia de mutações de alanina discretas nas alças de Adnectina 3116\_A06 (SEQ ID NO: 118) foram avaliados em ensaios bioquímicos e à base de células. O segundo estudo consistiu em profunda varredura mutacional em que criou-se uma biblioteca de mutações de único sítio nas mesmas posições de 3116\_A06 (ID SEQ 118), mas substituído cada posição com 20 dos aminoácidos possíveis.

Estes componentes da biblioteca foram então expressos como fusões de mRNA-proteína e submetidos a um único ciclo de exibição de mRNA (como descrito na Seção IV), separando os componentes da biblioteca com a miostatina associada biotinilada daqueles restantes não ligados utilizando esferas magnéticas com estreptavidina. Nesta abordagem, sequenciamento de próxima geração de entrada e populações ligadas permitiu a determinação da relação de enriquecimento / exaustão de cada sequência, refletindo sua afinidade intrínseca para a miostatina.

[00367] **Varredura de Alanina:** Mutagênese dirigida a sítio de PCR foi usada para criar mutações pontuais no local de alanina 3116\_A06 (SEQ ID NO: 118) na alça BC (resíduos 25-33), alça DE (resíduos 55-58), e alça FG (resíduos 80-89). Os clones foram expressos em *E. coli* e purificados por HTPP como descrito no Exemplo 1. Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC, tal como descrito no Exemplo 2) confirmou que todas as proteínas substituídas por alanina eram predominantemente monoméricas (Tabela 14). Ambos ensaios ARE-luciferase (Exemplo 3) e HTRF (Exemplo 4) foram realizados. No ensaio de ligação de competição de HTRF, potências variaram de  $IC_{50} = 1,5$  nM e  $> 100$  nM (Tabela 14). A maioria das posições tolerou substituição de alanina no ensaio de HTRF, até certo ponto, com a exceção de Gly55, Arg56, e Gly57 da alça DE, para cuja ligação foi drasticamente reduzida ( $IC_{50} > 100$  nM). Um efeito menor ocorreu em posições Gly30 na alça BC, e Val80, Thr81 e Tyr88 na alça FG, ainda que mostrasse ligação, mas com um aumento de  $> 10$  vezes na  $IC_{50}$  em relação à sequência parental ("WT"). No ensaio de base celular de ARE-luciferase, a potência de mutantes variou de  $IC_{50} = 0,6$  nM a  $> 100$  nM (Tabela 14). O impacto das mutações de alanina foi geralmente maior no ensaio baseado em células em relação ao ensaio de HTRF. Gly55, Arg56, e Gly57 da alça DE e Val80 e Tyr88 da alça FG todos exibiram potência drasticamente reduzida neste ensaio, com valores de  $IC_{50} >$

100 nM. Um efeito mais moderado foi observado para as posições BC Leu26, Pro27, His28, Gly30, e Asn33, Thr81 e posições FG, Tyr85, e Leu86, onde todos tinham valores de IC50 > 10 vezes o da sequência parental.

**Tabela 14:** Caracterização bioquímica e potências à base de células para mutantes de alanina de 3116\_A06

	Mutação	SEC*	Miostatina HTRF IC50 (nM)	Miostatina ARE-luc IC50 (nM)
	WT parental	1	0,3	0,6
<b>BC</b>	S25A	1	0,8	2,9
	L26A	1	2,3	16
	P27A	1	1,0	10
	H28A	1	0,8	6,2
	Q29A	1	0,7	1,5
	G30A	2	5,1	40
	K31A	1	0,6	2,2
	N33A	1	2,0	9,8
<b>DE</b>	G55A	2	>100	>100
	R56A	1	55	>100
	G57A	1	>100	>100
	V58A	2	1,6	3,3
<b>FG</b>	V80A	1	4,0	>100
	T81A	1	4,9	32
	D82A	1	0,8	1,8
	T83A	1	1,3	1,8
	G84A	1	2,0	3,6
	Y85A	1	2,0	5,5
	L86A	2	1,4	12
	K87A	1	0,8	2,0
	Y88A	1	11	>100
	K89A	1	0,7	1,6

[00368] SEC1: Altamente monomérico; SEC 2; a maioria monomérico

[00369] **Varredura Mutacional Profunda:** Sequenciamento de alta

capacidade de vazão foi combinado com apresentação de proteína para permitir a medição simultânea da aptidão relativa de cada possível mutante de alça de único local, em uma escala que seria onerosa para uma abordagem tradicional, como descrito acima (para revisão de abordagens de "Varredura mutacional profunda", vide Araya et al., *Trends in Biotechnology* 29: 435-442, 2011 uma abordagem semelhante é ainda exemplificada em Forsyth et al., *mAbs* 5 523-532, 2013).

[00370] **Construção e Seleção de Biblioteca:** Três bibliotecas separadas foram criadas que continham cada possível mutação de local único, em cada um dos três alças de 3116\_A06 (SEQ ID NO: 118): alça BC (posições 25-33), alça DE (posições 55-58) e alça FG (posições 80-89). Para cada alça, foram concebidos vários oligonucleotídeos que individualmente incorporaram um códon de NNK em cada posição, onde N = A, C, G, T e K = G, T. O uso destes códons degenerados para permitir a codificação de todos os 20 aminoácidos (mais um códon de paragem) na posição em que está incorporado o NNK. Os oligonucleotídeos foram montados via sobreposição de extensão de PCR para gerar as bibliotecas de Adnectina completos, onde Lib-BC continha cada única mutação de alça de BC de aminoácido de 3116\_A06, Lib-DE continha cada única mutação de alça de DE de aminoácido de 3116\_A06, e Lib-FG continha cada única mutação de alça de FG de aminoácido de 3116\_A06. As três bibliotecas foram expressas como moléculas de fusão mRNA-proteína utilizando profusão de acordo com Xu et al., *Chemistry & Biology* 9: 933-942, 2002. Moléculas de profusão Lib-BC, Lib-DE, e Lib-FG foram selecionadas separadamente contra 3 nM de miostatina biotinilada, e moléculas de ligação foram posteriormente capturadas em esferas magnéticas de estreptavidina. Os aglutinantes foram eluídos a partir das esferas utilizando 100 mM de KOH. As moléculas eluídas a partir das pérolas representam variantes de 3116\_A06 que ainda podem se ligar a

miostatina, enquanto que aqueles presentes na biblioteca inicial, mas não foi encontrado na eluição representam variantes de 3116\_A06 que não se ligam bem a miostatina.

[00371] **Código de barra e mistura de NGS:** Duas populações, entrada (antes da ligação da miostatina) e ligantes (eluição dos grânulos pós-seleção), derivadas cada uma das três bibliotecas (Lib-BC, DE-Lib, e Lib-FG) foram recoletadas e amplificadas separadamente. Cada população foi anexada com um Adaptador 5'TruSeq Universal, Adaptador II 3'Truseq, e um único código de barras de 6 de nucleotídeo por PCR. Um total de seis populações de código de barras, em seguida, foram quantificadas individualmente e misturadas (Lib-BC: Lib-DE: Lib-FG = 9: 4: 10) com base no número de resíduos aleatórios em cada alça, de forma a obter um número semelhante de sequências por posição estatisticamente aleatória. A amostra coletiva foi sequenciada por sequenciamento MiSeq de 150bp pareado-final (Illumina) de última geração.

[00372] **Análise de dados de NGS:** Sequências de leitura direta provenientes de sequenciamento de próxima geração foram finalmente resolvidas de acordo com a população, a posição de mutação, e identidade do aminoácido mutado. Todas as sequências de má qualidade e aquelas contendo vários sítios de mutação foram eliminadas da análise. Em seguida, a frequência de cada sequência na população pós-seleção foi dividida pela sua frequência na população de entrada para derivar uma relação de enriquecimento (ER). Comparação de ERs das sequências parentais (WT, que funciona como um controle positivo) e as sequências que contêm um códon de parada (que funcionam como um controle negativo, o que representa o ruído de fundo de sobrevivência por acaso) mostrou que a razão de sinal para fundo (S/B) variou entre as três alças, presumivelmente porque cada biblioteca de alça foi colocada através em seleções individualmente. Por

esta razão, cada sequência foi normalizada para a parada média e ERs em peso médio para seu própria alça específico, para derivar  $ER^{norma}$ .

$$ER^{norma} = \frac{ER - ER_{parada}}{ER_{ps} - ER_{parada}}$$

[00373] A varredura mutacional profunda foi validada através da comparação da aptidão relativa dos mutantes de alanina de sítio único com os dados bioquímicos da varredura de alanina tradicional. Em geral, a correlação foi muito forte (Figura 8). ERs NGS definem um perfil de enriquecimento e esgotamento dos mutantes de alanina através das alças que se correlaciona bem com o impacto observado em ensaios de HTRF e ARE-luciferase. O IC50 HTRF bioquímico também foi representado diretamente versus o  $ER^{norma}$  NGS para cada mutante de alanina, tal como mostrado na Figura 9.

[00374] Com base nas correlações de alanina, três categorias foram estabelecidas para que todas as mutações de aminoácidos do sítio único pudessem ser finalmente resolvidas via suas relações de enriquecimento de NGS: A maioria das mutações preferíveis ( $ER^{norma} > 0,8$ ), mutações mais preferíveis ( $ER^{norma} > 0,5$ ) e mutações preferíveis ( $ER^{norma} > 3$  desvios padrão da média de alça  $ER^{parada}$ ). Os limites inferiores de  $ER^{norma}$  definem a última categoria diferente para as três alças: BC = 0,25; DE = 0,15; FG = 0,35. Todos os mutantes de sítio único nas alças de 3116\_A06 foram finalmente resolvidos de acordo com as suas proporções de enriquecimento normalizadas para determinar a tolerância relativa de cada posição de mutação (Tabela 15).

**Tabela 15:** Mutações de sítio único nas sequências de alça de 3116\_A06 que mantêm ligação de miostatina

Posição	Mutações Preferíveis	Mutações mais Preferíveis	Mutações mais Preferíveis
25	X <sub>51</sub> ACD <sup>+</sup> FIH <sup>+</sup> IKLN <sup>+</sup> QRST <sup>+</sup> VWY	CFISVWY	FSW
26	X <sub>52</sub> LMV	L	L
27	X <sub>53</sub> ACDEIKLMNPQRSTVY	P	P

28	X <sub>54</sub>	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	CDEFGHIKLMNQRSTVWY	CFGIKLMNRSTVWY
29	X <sub>55</sub>	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACEFHILMPQRSTVY
30	X <sub>56</sub>	GS	G	G
31	X <sub>57</sub>	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	ACGHIKLMNQRSVWY	ACHKLMNRVWY
32	X <sub>58</sub>	ACGLMST	AGLMS	AGL
33	X <sub>59</sub>	ACFHNPQRSY	CHNQSY	HNQ
55		G	G	G
56		R	R	R
57		G	G	G
58	X <sub>60</sub>	ACDEFIKLMNQSTV	CEILMQTV	CEILMV
80	X <sub>61</sub>	ACFILMQTVWY	ACILMV	IV
81	X <sub>62</sub>	ACFGHIKLMNQRSTVWY	CFHILMQRSTVWY	CFILMTVWY
82	X <sub>63</sub>	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEFGHILMNPQRSTVWY	ACDEFGHILMNQSTV
83	X <sub>64</sub>	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	ACDFGILMNQSTVWY
84	X <sub>65</sub>	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	ADEFGHILMNQSTVWY	AGSTW
85	X <sub>66</sub>	ACFHILMNPSTVWY	CFILMPTVWY	FIWWY
86	X <sub>67</sub>	ACEFHILMNPQRSTVWY	CFHIKLMNQRTVWY	FHILMVWY
87	X <sub>68</sub>	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACEFGIKLMNPQRSTVWY	ACFGIKLMTVW
88	X <sub>69</sub>	FWY	WY	WY
89	X <sub>70</sub>	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEGHKLMNPQRSTV	AGKLMPCR

[00375] Usando os dados de varredura mutacional profunda completos, posições de alça BC 25, 26, 27, 30, 32 e 33, Posições de alça DE 55, 56 e 57, e posições de alça FG 80 e 88 parecem ser as mais conservadas, onde apenas um único ou alguns tipos de aminoácidos nestas posições mantêm ligação à miostatina. Por outro lado, as outras posições são altamente tolerantes à mutação, incluindo posições de alça BC 28, 29 e 31, e posições de alça FG 82, 83, e 87.

### **Exemplo 9 - Avaliação de Farmacocinética de Adnectina Antimiostatina**

[00376] Para investigar o perfil farmacocinético de Adnectinas com diferentes formatos PEGuilados, Adnectina antimioestatina 2987\_H07 foi formatada com PEG 40 K<sub>D</sub> de 2 ramificações (ATI-1338), PEG 40 K<sub>D</sub> de 4 ramificações (ATI-1339), e Bis PEG 20 K<sub>D</sub> (ATI-1341). Estudos de dose única de administração subcutânea com estas três Adnectinas PEGuiladas foram realizados em camundongos C57BL6. As concentrações totais de droga foram determinadas por ensaio de ELISA. Imunoensaio PK bioanalítico para a quantificação de ATI-1338

utilizou um ensaio de ELISA padrão em formato de sanduíche, em que o 1338 foi capturado com um anticorpo monoclonal para proteína HIS-TAG, então detectado com um anticorpo policlonal anti-PEG. Como mostrado na Tabela 16, os dois formatos PEGuilados 40 KD, ATI-1338 e ATI-1339, proveram potenciação farmacocinética mais proeminente (ou seja, mais da metade da vida ( $t_{1/2}$ ) e maior exposição normalizada de dose) que o formato de Bis-20 KD PEGylado, ATI-1341.

**Tabela 16.** Comparação de Farmacocinética de Três Formatos PEGuilados para Adnectina

Parâmetros PK	ATI-1338	ATI-1339	ATI-1341
Dose (mg/kg)	5	3.9	4
Cmax/Dose (nM/(mg/kg))	547	370	113
Tmax (h)	24	24	4
AUC/Dose (nM*h/(mg/kg))	32	23	2,1
$t_{1/2}$ (h)	25	31	16

[00377] Estudos de dose única seguintes à administração intravenosa ou subcutânea, Adnectinas antimioestatina fundidas com Fc (PRD-1177, PRD-1286, e PRD-1474) foram realizados em camundongos C57BL6 para avaliar os efeitos de fusão de Fc nos parâmetros farmacocinéticos. As concentrações totais de droga foram determinadas por ensaios de ELISA. Imunoensaio PK bioanalítico para a quantificação dos conjugados de Fc para PRD1177, 1474, e 1286 todos usaram um ensaio de ELISA em formato de sanduíche padrão utilizando tecnologia ECL, em que o 1177 foi capturado com um anticorpo policlonal para a Adnectina arcabouço, então detectada com um anticorpo IgG anti-humano. Como mostrado na Tabela 17, todas as três Adnectinas fundidas com Fc possuíam um tempo de meia-vida (58-172 h) do que a Adnectina PEGuilada ATI-1338 (25 h). A biodisponibilidade SC inferior provavelmente reflete a proteólise durante o trânsito intersticial e linfático da molécula biológica. A biodisponibilidade SC das Adnectinas fundidas com Fc estão dentro de

um intervalo razoável baseado na literatura publicada (por exemplo, Richter et al., AAPS J. 2012; 14: 559-70).

**Tabela 17.** Comparação de farmacocinética de três Adnectinas antimioestatina fundidas com Fc

Parâmetros PK	PRD-1177	PRD-1286	PRD-1474
Dose (mg/kg)	2	2	2
Clareza (mL/min/kg)	0,017	0,016	0,014
Vdss (L/kg)	0,093	0,190	0,054
t <sub>1/2</sub> (h)	68	172	58
Biodisponibilidade SC	60%	100%	94%

**Exemplo 10 - Mecanismo de Inibição de Adnectina antimioestatina**

[00378] ELISA competitivo: Ensaios de ligação competitivos para avaliar a capacidade dos Adnectinas antimioestatina para competir com o receptor ActRIIB de ligação a miostatina foram realizados utilizando o método ELISA competitivo. Placas Nunc Maxisorp foram revestidas com 2 ng/ml de ActRIIb-Fc (R&D Systems) em carbonato de sódio a 0,2 M pH 9,6 tampão durante a noite a 4 °C. Após lavagem com PBS-T (PBS contendo 0,05% de Tween-20), os poços foram bloqueados com tampão de OptEIA (BD Biosciences) durante 1 h a 25 °C com agitação. A miostatina (10 nM; R & D Systems) foi pré-incubada com um intervalo de concentração de Adnectina ou ActRIIb-Fc competidor (0,2 pM a 1 µM) em tampão OptEIA durante 1 h a 25 °C com agitação. A placa de ensaio revestida e bloqueada foi lavada com PBS-T, e em seguida foram adicionadas misturas miostatina / competidor e incubadas durante 30 min a 25 °C com agitação. A placa de ensaio foi lavada com PBS-T, após o que a miostatina ligada foi detectada com 1:1000 de cabra biotinilado policlonal antimioestatina (R&D Systems) diluída em OptEIA, durante 1 h a 25 °C com agitação. Após lavagem com PBS-T, 1:5000 de estreptavidina-HRP (Thermo / Pierce), diluída em OptEIA foi adicionado, seguido de incubação durante 30 min a 25 °C com agitação. A placa de ensaio foi desenvolvida com TMB (BD Biosciences),

arrefecida com ácido sulfúrico a 2N, e lida a absorvância A450. Como mostrado na Fig. 10, ActRIIb-Fc em solução bloqueia completamente a miostatina ActRIIb-Fc revestida na placa, como esperado. Em contraste, no entanto, PRD-1288 (difere de PRD-1474 apenas na sequência ligante), PRD-1285, e PRD-1286 em concentrações de até 1  $\mu$ M não bloqueiam miostatina da ligação com ActRIIb.

[00379] Competição de SPR: ensaios de ligação competitiva para avaliar a capacidade dos Adnectinas antimiostatina para competir com o receptores Tipo I e Tipo II para ligação a miostatina ou BMPI 1, como um substituto para a miostatina, também foram realizados utilizando SPR em um instrumento Biacore T100, em dois formatos experimentais diferentes. Em "Formato SPR A", superfícies de chip sensor foram preparadas através da imobilização de 100  $\mu$ g/ml de proteína A (Pierce) em 10 mM de acetato, pH 4,5-4500 RU de um chip sensor CM5 (Biacore/GE Healthcare) utilizando química etil (dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) / N-hidroxissuccinimida (NHS), com bloqueio de etanolamina. ALK4-Fc (R&D Systems), ALK5-Fc (R&D Systems), ActRIIB-Fc (produzida em casa), um anticorpo monoclonal antimiostatina / BMPI1 (mAb-A) que compete para a ligação da miostatina com ActRIIB mas não faz compete com 3116A06 para a ligação a miostatina (produzida em casa), ou Adnectina Fc-PRD-1474 em concentrações de 7-13 ng/ml foram capturados por meio da cauda Fc para densidades de superfície de 1600-4300 RU utilizando injeções de 60 s a 10  $\mu$ l/min. As experiências de competição foram realizadas fazendo passar 100 nM de miostatina (R&D Systems) ou BMPI 1 (R&D Systems) sobre essas superfícies, na ausência ou presença de 200 nM de Adnectina ATI-1523 a uma taxa de fluxo de 30  $\mu$ l/min com tempos de 180 s de associação e dissociação. O tampão de execução para as experiências de competição e de imobilização foi de 10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3 mM d EDTA, e 0,05% v/v de surfactante P20, pH

7,4, e as superfícies foram regeneradas usando ciclos entre duas injeções de 10 mM de glicina de pH 1,5 por 30 s em 30 µl/min.

[00380] Em Formato SPR A, BMP11 ligou-se especificamente a Fc-ALK4, ALK5-Fc, ActRIIB-Fc, mAb-A, e superfícies PRD-1474, enquanto que a miostatina ligou-se especificamente a ActRIIB-Fc, mAb-A, e PRD-1474, mas não a ALK4-Fc ou ALK5-Fc. Para avaliar o efeito da miostatina sobre ligação ATI-1523 ou BMP1 1, as respostas de ligação para cada proteína no final da fase de associação a 180 s cada uma foram normalizadas para 100%, e em comparação com as respostas de ligação para a miostatina ou BMP1 1 na presença de ATI-1523 (Tabela 18). ATI-1523 bloqueou completamente a ligação de miostatina ou BMP11 à superfície PRD-1474 de controle, como esperado. Nos ensaios para avaliar a capacidade de ATI-1523 para bloquear a interação da miostatina com ALK4-Fc ou ALK5-Fc, BMP-11, que também se liga a Fc-ALK4 e ALK5-Fc, foi utilizado como um substituto para a miostatina, uma vez que a miostatina sozinha não se liga de forma significativa a ALK4-Fc e ALK5-Fc sob este formato experimental. ATI-1523 reduziu significativamente o sinal de ligação para BMP1 1 para ALK4-Fc (98% de redução) e ALK5-Fc (69% de redução), sugerindo que a Adnectina compete para a ligação da miostatina com os receptores Tipo I. Em contraste, uma resposta aumentada de ligação foi observada para os complexos miostatina / ATI-1523 ou BMP1 1 / ATI-1523 sobre superfícies ActRIIB-Fc ou mAb-A, sugerindo que os complexos miostatina / ATI-1523 ou BMP1 1 / ATI-1523 são capazes de se ligar a estas superfícies, ou seja, a Adnectina não é competitiva com ActRIIB-Fc ou mAb-A. O grande aumento da resposta de ligação (>1000% de aumento) ao complexo miostatina / ATI-1523 em superfícies ActRIIB-Fc e mAb-A é consistente com a Adnectina tendo um efeito solubilizante sobre a miostatina.

**Tabela 18:** Resposta de ligação de SPR para 100 nM ou 100 nM de

miostatina BMPI 1 na ausência ou na presença de 200 nM ATI-1523 em superfícies ALK4-Fc, ALK5-Fc, ActRIIB-Fc, mAb-A, ou PRD-1474.

Analito	ALK4-Fc	ALK5-Fc	ActRIIB-Fc	mAb-A	PRD-1474
Miostatina			100%	100%	100%
Miostatina + ATI-1523			1313%	1544%	-2%
BMP11	100%	100%	100%	100%	100%
BMP11 + ATI-1523	2%	31%	189%	258%	-1%

[00381] Competição de Adnectina usando "formato SPR B": O mecanismo de ação para Adnectinas antimioestatina foi ainda avaliado em "Formato SPR B", onde a miostatina ou BMPI 1 (10 µg/ml em 10 mM de acetato, pH 4,5) foi diretamente imobilizada em uma superfície CM5 do chip sensor através de química de acoplamento EDC / NHS a uma densidade de 985 RU (miostatina) ou 530 RU (BMPI 1). Aqui, a resposta de ligação para os receptores de ALK4-Fc (R&D Systems), ALK5-Fc (R&D Systems), ou ActRIIB-monomer (produzido em casa), injetados por si só (2 µM durante 180 s a 30 µl/min), foi comparada com as respostas de ligação para estes receptores após pré-ligação de fusão Adnectina- Fc PRD-1474 à superfície (1 µM durante 480 s a 30 µl/min). O tampão de execução para as experiências de competição e de imobilização foi de 10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, e 0,05% v/v de surfactante P20, pH 7,4, e as superfícies foram regeneradas entre ciclos, utilizando 4 injeções de NaOH 50 mM durante 15 s em 30 µl/min.

[00382] Na ausência de PRD-1474, cada receptor ligou-se especificamente a BMPI 1 imobilizado, enquanto que apenas ALK5-Fc e ActRIIB-monômero, mas não ALK4-Fc, se ligou a miostatina imobilizada. Pré-ligação de PRD-1474 reduziu significativamente o sinal de ligação para ALK4-Fc no sentido BMPI 1 (70% de redução) e também reduziu a ligação de Fc-ALK5 no sentido da miostatina ou BMPI 1 (35-41 % de redução), mas teve um impacto mínimo em ligação ActRIIB-monômero para superfícies de miostatina ou BMPI, Tabela 19. Estes

dados, em conjunto com os dados de competição de SPR "Formato SPR A" (Tabela 18), os dados de ELISA competitivos (Fig. 10), e a inibição completa de sinalização de miostatina observada no ensaio ARE-luciferase (Fig. 11), demonstram que o mecanismo Adnectina de ação é bloqueio do recrutamento de receptores de sinalização Tipo I (ALK4/5), e que as Adnectinas não competem com ligação ao receptor Tipo II (ActRIIB).

**Tabela 19:** Resposta de ligação de SPR para 1  $\mu$ M de ALK4-Fc, ALK5-Fc, ou ActRIIB-monômero em superfícies de miostatina imobilizada ou BMP11 com ou sem PRD-1474 pré-ligado.

Superfície	Pré-ligação PRD-1474	ALK4-Fc	ALK5-Fc	ActRIIB-monômero
Miostatina	Não		100%	100%
	Sim		55%	111%
BMP11	Não	100%	100%	100%
	Sim	30%	65%	92%

[00383] Uma vez que estas Adnectinas representam as famílias de sequências exemplificadas na presente invenção, e os clones individuais dentro de uma família de sequência bem definida mantendo o mesmo sítio de ligação, as sequências abrangidas pela invenção atuam por bloqueio atual de recrutamento de ALK4/5 para o complexo miostatina-ActRIIB.

[00384] Os dados farmacocinéticos indicam ainda que níveis complexos de miostatina-Adnectina se acumulam com o tempo e que estes complexos se ligam a ActRIIB, agindo, assim, como um inibidor negativo dominante de sinalização independente da droga livre. Este mecanismo exclusivo distingue as Adnectinas antimioestatina da presente invenção de anticorpos antimioestatina descritos na literatura (por exemplo, US 7.632.499), e indicam que as Adnectinas antimioestatina da invenção tem atividade aumentada.

**Exemplo 11: Mapeamento do sítio de ligação à Adnectina em miostatina usando HDX-MS:**

[00385] O sítio de ligação de Adnectina em miostatina foi avaliado ainda utilizando espectrometria de massa de troca de hidrogênio-deutério (HDX-MS).

[00386] O método de espectrometria de massa de troca de hidrogênio / deutério (HDX-MS) sonda a conformação da proteína e dinâmicas conformacionais em solução monitorando a taxa de troca de deutério e extensão nos hidrogênios de amida da estrutura principal. O nível de HDX depende da acessibilidade do solvente de hidrogênios de amida de estrutura principal e da conformação da proteína. O aumento da massa da proteína sobre HDX pode ser medido com precisão por MS. Quando esta técnica é emparelhada com a digestão enzimática, as características estruturais ao nível do peptídeo podem ser obtidas, permitindo uma diferenciação de peptídeos expostos na superfície daqueles dobrados dentro, ou daqueles sequestrados na interface de um complexo proteína-proteína. Tipicamente, a rotulagem de deutério e experiências de inibição subsequentes são realizadas, seguido por digestão com pepsina em linha, separação de peptídeos, e análise por MS.

[00387] Porque miostatina sozinha foi encontrada para ter inadequadamente baixa solubilidade para HDX-MS sob condições de pH fisiologicamente relevantes (<10 µg/ml), foi utilizada uma estratégia alternativa para aumentar a solubilidade de miostatina através da complexação com a proteína do fragmento Fab do mAb-A (Fab-A), que foi demonstrado ser não competitivo com a Adnectina usando as experiências de SPR descritas no Exemplo 10. O estado oligomérico das amostras de HDX-MS foi caracterizado por cromatografia de exclusão de tamanho acoplada a um detector multiângulo de dispersão de luz laser (SEC-MALS), onde a massa determinada por MALS do complexo de miostatina / Fab-A (~120 kDa) foi consistente com a estequiometria esperada de um homodímero de miostatina ligado

a duas moléculas de Fab-A, e a massa determinada por MALS do complexo de miostatina / Fab-A / 3116\_A06 (142 kDa) era consistente com a estequiometria esperada de um homodímero de miostatina ligado a duas moléculas Fab-A mais duas moléculas 3116\_A06.

[00388] Antes de mapear o sítio de ligação sobre a miostatina Adnectina reconhecida por Adnectina 3116\_A06 por HDX-MS, as experiências não deuteradas foram realizadas para gerar uma lista de peptídeos pépticos comuns para a miostatina a partir de miostatina / Fab-A (1:1:1 de razão molar a cada 30  $\mu$ M) e miostatina / Fab-A / 3116\_A06 (1:1 de razão molar a cada 30  $\mu$ M) as amostras, atingindo uma cobertura sequência de 83,5% para a miostatina. Nesta experiência, 10 mM de tampão de fosfato (pH 7,0) foi usado durante a etapa de rotulagem, seguido por adição de tampão de arrefecimento (200 mM de tampão de fosfato com GdnCl a 4M e TCEP a 0,5 M, pH 2,5, 1:1, v/v). Para experiências de mapeamento de sítio de ligação de Adnectina, 5  $\mu$ L de cada amostra (miostatina / Fab-A ou miostatina / Fab-A / 3116\_A06) foi misturado com 65  $\mu$ l de tampão de marcação HDX (10 mM de tampão de fosfato em D2O, pH 7,0) para iniciar as reações de rotulagem à temperatura ambiente ( $\sim 25$  °C). As reações foram realizadas por diferentes períodos de tempo: 20 s, 1 min, 10 min, 60 min e 240 min. No final de cada período de reação de rotulagem, a reação foi arrefecida pela adição de tampão de arrefecimento (1:1, v/v) e a amostra arrefecida foi injetada no sistema Waters HDX-MS para análise. Os peptídeos pépticos comuns observados foram monitorizados para os seus níveis de captação de deutério na ausência / presença de 3116\_A06.

[00389] Os dados experimentais obtidos a partir de medições de HDX-MS indicam que Adnectina 3116\_A06 reconhece um sítio de ligação de Adnectina descontínua compreendido por duas regiões peptídicas em miostatina:

[00390] Região 1: LYFNGKEQIIYGKIPAM (85-101); SEQ ID NO: 329

[00391] Região 2: PHTHLVHQANP (56-66); SEQ ID NO: 330

[00392] Com base em níveis de captação de deutério relativos, as duas regiões de peptídeos podem ser classificadas como região 1 > 2, com a região 1 tendo as mudanças mais significativas na captação de deutério.

### **Exemplo 12 - ancoragem *in silico* de Adnectina 3116\_A06 para miostatina**

[00393] Uma abordagem computacional foi utilizada para gerar um modelo estrutural do complexo 3116\_A06-miostatina que era consistente com os dados de HDX-MS (Fig. 13). A proteína de ancoragem de 3116\_A06 na estrutura da miostatina humana (PDB 3HH2 retirada do Banco de Dados de Proteína, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org); Cash et al., *EMBO J.* 28: 2662-2676, 2009.) foi realizada utilizando ZDOCK (Chen e Wang, *Proteins* 47:281-294, 2002), como implementado no software Accelrys Discovery Studio v3.5 (Accelrys). O protocolo ZDOCK utiliza acoplamento de corpo rígido de duas estruturas de proteínas (ligando = 3116\_A06 e receptor = miostatina). As doses ancoradas foram filtradas para complexos que continham conformações de alças 3116\_A06 FG (resíduos Thr79 a Tyr88) e BC (resíduos Ser25 a N33). Um complexo preferido foi selecionado com base na complementaridade dos resíduos de interface acoplados com correlação das substituições favoráveis de alça identificadas por mutagênese de Adnectina. **Fig. 13A** mostra o sítio de ligação de ALK4 e o sítio de ligação de ActRIIB mapeado sobre a estrutura da miostatina (cinza). Regiões 1 e 2, as quais foram identificadas por experiências de HDX-MS tal como descrito no Exemplo 11, estão indicadas em preto. **Fig. 13B** mostra um complexo preferido de ancoragem, com a alça BC, DE e FG de 3116\_A06 (preto) preferido em barra, e Regiões 1 e 2 da miostatina (cinza) representadas no espaço de preenchimento. Vários

resíduos que foram identificados como mutações favoráveis de alça mostram as contribuições fundamentais. Por exemplo, na alça BC de 3116\_A06, os resíduos Ser25, Leu26, e Pro27 são importantes como restrições estruturais para manter a conformação de alça geral. Em contraste Ala32 se encaixa em uma pequena fenda hidrofóbica formada na interface complexa e a estrutura principal do resíduo e forma ligações de hidrogênio com a miostatina. As substituições mais preferidas na posição 32 é Gly ou Leu, e elas são previstas para se encaixar bem no lugar da alanina. Da mesma forma, Asn33 está envolvida com ligações de hidrogênio para resíduos de triptofano vizinhos de miostatina. As substituições mais preferidas na posição 33 são His e Gin, que também contêm cadeias laterais que podem contribuir como doadores de ligação de hidrogênio. Os resíduos na alça DE são críticos: as substituições mais favoráveis estão limitadas a Gly55, Arg56, e Gli 57, e apenas substituições conservadoras são preferíveis para Val58. Na estrutura do modelo, Arg56 é um resíduo crítico contribuindo interações cátions pi com Y86 da miostatina na Região 1, bem como ligações de hidrogênio adicionais com a estrutura principal e cadeia lateral de outros resíduos de região 1. Para muitos resíduos de alça FG, as substituições mais preferíveis eram substituições conservadoras. Uma posição crítica identificada foi Tyr88, que tem interações de cátion pi e interações pi-pi com Y55 e outros resíduos da Região 2 da miostatina. A alça FG também está envolvido com diversas interações hidrofóbicas com ambas as Regiões 1 e 2 identificadas a partir das experiências de mutagênese. Estes cálculos mostram boa concordância com dados da experiência de HDX-MS e de SPR.

### **Exemplo 13 - Modelo de camundongo *in vivo* de eficácia músculo-esquelética**

[00394] Camundongos B6 SCID machos (9-13 semanas de idade, Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) foram alojados em um quarto

com temperatura controlada, com um ciclo luz / escuro de 12 horas invertidas. Água e ração de comida padrão estavam disponíveis ad libitum. Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente e divididos entre os grupos de tratamento para receber controle ou compostos de teste da presente invenção com base no peso corporal (cerca de 20-22 g). A fim de demonstrar a eficácia in vivo dos compostos da presente invenção, os compostos foram administrados quer semanalmente (fusão Fc Adnectinas antimioestatina) ou duas vezes por semana (Adnectinas antimioestatina PEGiladas) por injeção subcutânea. Os compostos de teste foram administrados aos animais em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS). Os controles foram tratados apenas com tampão de reconstituição. Os animais de teste (n = 8-10 camundongos / grupo) foram doseados por via subcutânea durante uma janela de tempo de 14 dias, por exemplo, com, 5, 6 ou 10 mg/kg/semana de um composto da invenção. As medições de peso do corpo foram registradas pré-aleatorização, no dia da aleatorização, e duas a três vezes por semana durante os períodos de tratamento e no final do estudo. Massa muscular da perna foi gravada a partir de carcaças corpo no final do estudo por análise de imagem de ressonância magnética quantitativa (MRI, Echo Medical Systems, Tex). Os grupos de teste foram comparados com o grupo de controle. Os resultados mostram que Adnectinas antimioestatina da invenção aumentaram percentual de peso corporal a partir da linha de base (Fig. 14) e teve efeitos anabólicos significativos no volume do músculo esquelético (Fig. 15), em comparação com camundongos de controle (por exemplo, aproximadamente 7-10% de um aumento do volume muscular em relação ao controle).

#### ***Imagem de ressonância magnética (MRI)***

[00395] MRI para medições de volume muscular da perna foi realizada em um Bruker PharmaScan 4.7 Tesla com um furo de 16 cm

(Bruker Biospin, Billerica, Ma. EUA). Uma bobina de 62 mm de volume foi utilizada para o transmissor e receptor. Após a coleta de imagens localizadoras da perna, imagens ponderadas T2 foram obtidas utilizando um plano de corte axial. A sequência de spin-echo rápido (RARA) consistiu em um pulso Hermite de 90° seguido de um pulso Hermite de 180° com um TR/TE = 2000/23ms. Onze cortes axiais foram coletados a partir do topo do joelho até o tornozelo com uma dimensão da matriz de 256 x 128 pontos de dados. O campo de visão foi de 5 cm por 2,5 cm, com uma espessura de corte de 1,25 mm e um fator RARO de 4 e 8 médias de sinal. Volumes do músculo da perna foram calculados pela soma de todas as áreas de corte axial multiplicadas pela espessura de corte 1,25 mm para o volume total do músculo em cada perna. As imagens foram analisadas como uma média de área da região de interesse (ROI), por Análise de Sequência de Imagens (ISA, Bruker Biospin, Billerica, Ma.). ROIs manuais foram elaborados em torno do músculo da perna excluindo a pele e área de gordura subcutânea. O volume do músculo médio total para as duas pernas é mostrado na Fig. 15.

[00396] MRI para volumes do coração como um ponto final de segurança também foi realizado com o mesmo scanner de MRI. Após a obtenção de imagens localizadoras iniciais da região torácica, 9 imagens axiais foram coletadas a partir dos grandes frascos para o ápice do coração. Semelhante à análise dos músculos das pernas, as áreas axiais foram adicionadas e multiplicadas pela espessura do corte de 1,25 mm, para obter o volume de coração total para cada animal. Nenhuma mudança significativa no volume do coração foi observada por MRI.

### ***Estatísticas***

[00397] Diferenças entre os grupos foram avaliadas por meio de análise pareada de cauda de teste t de Student 2.

**Exemplo 14 - Eficácia de PRD-1474 em crescimento muscular *in vivo***

[00398] Camundongos B6 SCID machos (n = 10 / grupo) foram mantidos e tratados como descrito no Exemplo 10, com a exceção de que PRD-1474 foi administrado nas doses diferentes conforme indicado na Fig. 16, e a duração do tratamento foi de 28 dias. PRD-1474 a 1 mg/kg mostrou um aumento significativo de 11,1% em volume do músculo da perna menor em comparação com o grupo de controle PBS (p <0,0001). Aumentos significativos no volume do músculo da perna menor de 27,7%, 29,7%, e 32,8% foram também observados com PRD-1474 a 10 mg/kg, 30 mg/kg, e 100 mg/kg, respectivamente. Nenhuma mudança no volume do coração foi observada em todos os grupos de dose de tratamento em relação ao de controle. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Os vários grupos de dosagem foram comparados usando ANOVA. (\*p <0,0001; # não significante entre os grupos).

[00399] Os dados demonstram que as Adnectinas antimiostatina da invenção são eficazes em dosagens significativamente mais baixas do que os inibidores da miostatina anteriormente descritos (por exemplo, US 7.632.499, J. Clin. Oncol. 30 (Suppl): Abstr. 2.516, de 2012).

[00400] Assim, as Adnectinas antimiostatina da invenção proporcionam uma maior eficácia em doses mais baixas combinadas com menores efeitos colaterais indesejáveis, quando administradas sozinhas ou em combinação com outros inibidores da miostatina ou outras drogas, para o tratamento de perda de massa muscular e doenças metabólicas aqui descritos.

**MODALIDADES**

[00401] Um polipeptídeo compreendendo o décimo domínio tipo III de fibronectina (<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3) em que o <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 tem pelo menos uma alça selecionada a partir da alça BC, DE, e FG com uma Sequência de

Aminoácido alterada em relação à sequência da alça correspondente do domínio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano, e em que o polipeptídeo liga miostatina.

[00402] O polipeptídeo da modalidade 1, em que o polipeptídeo liga miostatina com uma K<sub>D</sub> de menos do que 500 nM.

[00403] O polipeptídeo das modalidades 1 ou 2, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>1</sub>-L-P-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>, em que,

[00404] X<sub>1</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em S, T e Y;

[00405] X<sub>2</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em H, Y, N, R, F, G, S e T;

[00406] X<sub>3</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, P, Q, S, F, H, N e R;

[00407] X<sub>4</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em G e A;

[00408] X<sub>5</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em H, L, R, V, N, D, F, I e K;

[00409] X<sub>6</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, L, G, M, F, I e V; e

[00410] X<sub>7</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em H e N.

[00411] O polipeptídeo da modalidade 3, em que X<sub>1</sub> é S.

[00412] O polipeptídeo das modalidades 3 ou 4, em que X<sub>2</sub> é H ou Y.

[00413] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 3-5, em que X<sub>3</sub> é A ou P.

[00414] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 3-6, em que X<sub>4</sub> é G.

[00415] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 3-7, em que X<sub>5</sub> é H, L ou R.

[00416] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 3-8, em que X<sub>6</sub> é A ou L.

[00417] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 3-9, em que X<sub>7</sub> é H.

[00418] O polipeptídeo da modalidade 3, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7, 11-21, 23-31, 34, e 36-38.

[00419] O polipeptídeo da modalidade 11, em que a alça BC compreende a sequência de aminoácido estabelecida em SEQ ID NO: 34.

[00420] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G-X<sub>8</sub>, em que X<sub>8</sub> é V ou L.

[00421] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que a alça DE compreende um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 39 e 42.

[00422] O polipeptídeo da modalidade 14, em que a alça DE compreende a sequência de aminoácido estabelecida em SEQ ID NO: 39.

[00423] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub>-X<sub>18</sub>, em que

[00424] X<sub>9</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em L, V e I;

[00425] X<sub>10</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em T e S;

[00426] X<sub>11</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em K, R, A, G, S, D, H, N, T e P;

[00427] X<sub>12</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em S, T, A, E, H, K e N;

[00428] X<sub>13</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em K, G, Q, D, E, N, T e S;

[00429] X<sub>14</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em V, I, F, L, M, P, T e Y;

[00430] X<sub>15</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em I, L e Y;

- [00431]  $X_{16}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em H, I, V, K, L, R, F, G, S e T;
- [00432]  $X_{17}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em Y e H; e
- [00433]  $X_{18}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em K, M, L, R e V.
- [00434] O polipeptídeo da modalidade 16, em que  $X_9$  é L ou V.
- [00435] O polipeptídeo das modalidades 16 ou 17, em que  $X_{10}$  é T.
- [00436] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 16-18, em que  $X_{11}$  é K ou R.
- [00437] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 16-19, em que  $X_{12}$  é S ou T.
- [00438] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 16-20, em que  $X_{13}$  é K, G ou Q.
- [00439] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 16-21, em que  $X_{14}$  é V ou I.
- [00440] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 16-22, em que  $X_{15}$  é I.
- [00441] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 16-23, em que  $X_{16}$  é H, I ou V.
- [00442] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 16-24, em que  $X_{17}$  é Y.
- [00443] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 16-25, em que  $X_{18}$  é K ou M.
- [00444] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que a alça FG compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 46, 50-62, 64-72, 75-77, e 79.
- [00445] O polipeptídeo da modalidade 27, em que a alça FG compreende a sequência de aminoácido estabelecida em SEQ ID NO: 75.

- [00446] O polipeptídeo das modalidades 1 ou 2, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A$ , em que
- [00447]  $X_{19}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em D, E, V e W;
- [00448]  $X_{20}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, S e V;
- [00449]  $X_{21}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em R, A, G, K e L; e
- [00450]  $X_{22}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L e R.
- [00451] O polipeptídeo da modalidade 29, em que  $X_{19}$  é D.
- [00452] O polipeptídeo das modalidades 29 ou 30, em que  $X_{20}$  é A.
- [00453] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 29-31, em que  $X_{21}$  é R ou A.
- [00454] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 29-32, em que  $X_{22}$  é L.
- [00455] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 29-33, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 8-10, 22, 32, 33, e 35.
- [00456] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 1, 2 e 27-34, em que a alça DE compreende e Sequência de Aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{23}-G-R-G-X_{24}$ , em que
- [00457]  $X_{23}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em V, P, F, I e L; e
- [00458]  $X_{24}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em S, N e T.
- [00459] O polipeptídeo da modalidade 35, em que a alça DE compreende e sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 40, 41, e 43-45.
- [00460] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 1, 2 e 29-36, em que a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{31}-X_{32}$ , em que

- [00461] X<sub>25</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em I e V;
- [00462] X<sub>26</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em F, D e Y;
- [00463] X<sub>27</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em D e T;
- [00464] X<sub>28</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em P, M, V e T;
- [00465] X<sub>29</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em V, L, N, R e S;
- [00466] X<sub>30</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em H, T, L, N, Q e S;
- [00467] X<sub>31</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em F, W, Y, H e L; e
- [00468] X<sub>32</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em D, A e G.
- [00469] O polipeptídeo da modalidade 37, em que X<sub>25</sub> é I.
- [00470] O polipeptídeo das modalidades 37 ou 38, em que X<sub>26</sub> é F.
- [00471] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 37-39, em que X<sub>27</sub> é D.
- [00472] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 37-40, em que X<sub>28</sub> é P.
- [00473] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 37-41, em que X<sub>29</sub> é V.
- [00474] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 37-42, em que X<sub>30</sub> é H ou T.
- [00475] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 37-43, em que X<sub>31</sub> é F ou W.
- [00476] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 37-44, em que X<sub>32</sub> é D.
- [00477] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 37-45, em que a alça FG compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 47-49, 63, 73, 74, e 78.
- [00478] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades

precedentes, em que o polipeptídeo compreende uma alça BC e uma alça DE.

[00479] O polipeptídeo da modalidade 47, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7-38, e a alça DE compreende e sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 39-45.

[00480] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 1-46, em que o polipeptídeo compreende uma alça BC e alça FG.

[00481] O polipeptídeo da modalidade 49, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7-38, e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 46-79.

[00482] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 1-46, em que o polipeptídeo compreende uma alça DE e uma alça FG.

[00483] O polipeptídeo da modalidade 51, em que a alça DE compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 39-45, e a alça FG compreende e sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 46-79.

[00484] O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o polipeptídeo compreende uma alça BC, uma alça DE e uma alça FG.

[00485] O polipeptídeo da modalidade 53, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7-38, a alça DE compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 39-45, e a alça FG compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs:

46-79.

[00486] O polipeptídeo da modalidade 54, em que a alça BC compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 34, a alça DE compreende SEQ ID NO: 39, e a alça FG compreende SEQ ID NO: 75.

[00487] O polipeptídeo da modalidade 55, em que a sequência de alça BC tem 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições de aminoácido; a alça DE tem 1 substituição de aminoácido, e a alça FG tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 substituições de aminoácido.

[00488] O polipeptídeo da modalidade 56, em que

[00489] a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{33}\text{-L-P-X}_{34}\text{-X}_{35}\text{-X}_{36}\text{-X}_{37}\text{-X}_{38}\text{-X}_{39}$ , em que,

[00490]  $X_{33}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em T e Y;

[00491] (ii)  $X_{34}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em Y, N, R, F, G, S, e T;

[00492] (iii)  $X_{35}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, P, S, F, H, N, e R;

[00493] (iv)  $X_{36}$  é A;

[00494] (v)  $X_{37}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em H, L, R, V, N, D, F, e I;

[00495] (vi)  $X_{38}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L, G, M, F, I, e V; e

[00496] (vii)  $X_{39}$  é H;

[00497] (b) a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $G\text{-R-G-X}_{40}$ , em que  $X_{40}$  é L; e

[00498] (c) a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{41}\text{-X}_{42}\text{-X}_{43}\text{-X}_{44}\text{-X}_{45}\text{-X}_{46}\text{-X}_{47}\text{-X}_{48}\text{-X}_{49}\text{-X}_{50}$ , em que

[00499]  $X_{41}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L e I;

[00500] (ii)  $X_{42}$  é S;

[00501] (iii)  $X_{43}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em K, R, A, G, S, H, N, T, e P;

- [00502] (iv)  $X_{44}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em S, A, E, H, K, e N;
- [00503] (v)  $X_{45}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em K, Q, D, E, N, T, e S;
- [00504] (vi)  $X_{46}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em V, I, F, L, M, P, e T;
- [00505] (vii)  $X_{47}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em I e Y;
- [00506] (viii)  $X_{48}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em H, I, V, L, R, F, G, S, e T;
- [00507] (ix)  $X_{49}$  é H; e
- [00508] (x)  $X_{50}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em M, L, R, e V.
- [00509] 58. O polipeptídeo das modalidades 1 ou 2, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ , em que,
- [00510]  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00511]  $X_{52}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L, M, e V;
- [00512]  $X_{53}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, e Y;
- [00513]  $X_{54}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00514]  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00515]  $X_{56}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em G e S;
- [00516]  $X_{57}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00517]  $X_{58}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, G, L, M, S, e T; e
- [00518]  $X_{59}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F,

H, N, P, Q, R, S, e Y.

[00519] 59. O polipeptídeo da modalidade 58, em que:

[00520] X<sub>51</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, S, V, W, e Y;

[00521] X<sub>52</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em L;

[00522] X<sub>53</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em P;

[00523] X<sub>54</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00524] X<sub>55</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00525] X<sub>56</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em G;

[00526] X<sub>57</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, e Y;

[00527] X<sub>58</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, L, M, e S; e

[00528] X<sub>59</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em C, H, N, Q, S, e Y.

[00529] 60. O polipeptídeo da modalidade 59, em que:

[00530] X<sub>51</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em F, S, e W;

[00531] X<sub>52</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em L;

[00532] X<sub>53</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em P;

[00533] X<sub>54</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W, e Y;

[00534] X<sub>55</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, e Y;

[00535] X<sub>56</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em G;

[00536] X<sub>57</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, H, K, L, M, N, R, V, W, e Y;

[00537] X<sub>58</sub> é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, e L;  
e

- [00538]  $X_{59}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em H, N, e Q.
- [00539] 61. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 58-60, em que  $X_{51}$  é S.
- [00540] 62. O polipeptídeo da modalidade 58, em que  $X_{52}$  é L.
- [00541] 63. O polipeptídeo da modalidade 58, em que  $X_{53}$  é P
- [00542] 64. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 58, 59, e 61-63, em que  $X_{54}$  é H.
- [00543] 65. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 58-64, em que  $X_{55}$  é Q.
- [00544] 66. O polipeptídeo da modalidade 58, em que  $X_{56}$  é G.
- [00545] 67. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 58-66, em que  $X_{57}$  é K.
- [00546] 68. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 58-67, em que  $X_{58}$  é A.
- [00547] 69. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 58-68, em que  $X_{59}$  é N.
- [00548] 70. O polipeptídeo da modalidade 58, em que a alça BC compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7, 11-21, 23-31, 34, e 36-38.
- [00549] 71. O polipeptídeo da modalidade 70, em que a alça BC compreende a sequência de aminoácido estabelecida em SEQ ID NO: 34.
- [00550] 72. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 58-71, em que a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula G-R-G- $X_{60}$ , em que  $X_{60}$  é A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T, e V.
- [00551] 73. O polipeptídeo da modalidade 72, em que  $X_{60}$  é C, E, I, L, M, Q, T, e V.
- [00552] 74. O polipeptídeo da modalidade 73, em que  $X_{60}$  é C, E, I, L, M, e V.

- [00553] 75. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 72-74, em que  $X_{60}$  é V.
- [00554] 76. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 58-75, em que a alça DE compreende um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 39 e 42.
- [00555] 77. O polipeptídeo da modalidade 76 em que a alça DE compreende a sequência de aminoácido estabelecida em SEQ ID NO: 39.
- [00556] 78. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 58-77, em que a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ , em que
- [00557]  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W, e Y;
- [00558]  $X_{62}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00559]  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00560]  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00561]  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00562]  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W, e Y;
- [00563]  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00564]  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00565]  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, W, e Y;
- e
- [00566]  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D,

E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y.

[00567] 79. O polipeptídeo da modalidade 78, em que:

[00568]  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, I, L, M, e V;

[00569]  $X_{62}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00570]  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, e Y;

[00571]  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00572]  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;

[00573]  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, L, M, P, T, V, W, e Y;

[00574]  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, e Y;

[00575]  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00576]  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e

[00577]  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, e V.

[00578] 80. O polipeptídeo da modalidade 79, em que:

[00579]  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em I e V;

[00580]  $X_{62}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, L, M, T, V, W, e Y;

[00581]  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, e V;

[00582]  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;

[00583]  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, S,

T, e W;

[00584]  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, I, V, W, e Y;

[00585]  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, H, I, L, M, V, W, e Y;

[00586]  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, G, I, K, L, M, T, V, e W;

[00587]  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e

[00588]  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, K, L, M, P, Q, e R.

[00589] 81. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 78-80, em que  $X_{61}$  é V.

[00590] 82. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 78-81, em que  $X_{62}$  é T.

[00591] 83. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 78-82, em que  $X_{63}$  é D.

[00592] 84. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 78-83, em que  $X_{64}$  é T.

[00593] 85. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 78-84, em que  $X_{65}$  é G.

[00594] 86. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 78-85, em que  $X_{66}$  é Y.

[00595] 87. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 78-86, em que  $X_{67}$  é L.

[00596] 88. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 78-87, em que  $X_{68}$  é K.

[00597] 89. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 78-88, em que  $X_{69}$  é Y.

[00598] 90. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 78-89, em que  $X_{70}$  é K.

- [00599] 91. O polipeptídeo da modalidade 1 ou 2, em que
- [00600] a alça BC compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ , em que,
- [00601]  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00602] (ii)  $X_{52}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em L, M, e V;
- [00603] (iii)  $X_{53}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, e Y;
- [00604] (iv)  $X_{54}$  é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00605] (v)  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00606] (vi)  $X_{56}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em G e S;
- [00607] (vii)  $X_{57}$  é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00608] (viii)  $X_{58}$  é A, C, G, L, M, S, e T; e
- [00609] (ix)  $X_{59}$  é A, C, F, H, N, P, Q, R, S, e Y;
- [00610] (b) a alça DE compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $G-R-G-X_{60}$ , em que  $X_{60}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T, e V; e
- [00611] (c) a alça FG compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a fórmula  $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ , em que
- [00612]  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W, e Y;
- [00613] (ii)  $X_{62}$  é A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00614] (iii)  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;
- [00615] (iv)  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C,

D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00616] (v)  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00617] (vi)  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W, e Y;

[00618] (vii)  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00619] (viii)  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00620] (ix)  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, W, e Y; e

[00621] (x)  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y.

[00622] 92. O polipeptídeo da modalidade 91, em que:

[00623] (i)  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, S, V, W, e Y;

[00624] (ii)  $X_{52}$  é L;

[00625] (iii)  $X_{53}$  é P;

[00626] (iv)  $X_{54}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00627] (v)  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00628] (vi)  $X_{56}$  é G;

[00629] (vii)  $X_{57}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, e Y;

[00630] (viii)  $X_{58}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, L, M, e S; e

[00631] (ix)  $X_{59}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, H, N, Q, S, e Y;

[00632] (b)  $X_{60}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, E,

I, L, M, Q, T, e V; e

[00633] (c) (i)  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, I, L, M, e V;

[00634] (ii)  $X_{62}$  é C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00635] (iii)  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, e Y;

[00636] (iv)  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00637] (v)  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;

[00638] (vi)  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, I, L, M, P, T, V, W, e Y;

[00639] (vii)  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, e Y;

[00640] (viii)  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;

[00641] (ix)  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e

[00642] (x)  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y.

[00643] 93. O polipeptídeo da modalidade 92, em que:

[00644] (i)  $X_{51}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, S, e W;

[00645] (ii)  $X_{52}$  é L;

[00646] (iii)  $X_{53}$  é P;

[00647] (iv)  $X_{54}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W, e Y;

[00648] (v)  $X_{55}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, e Y;

[00649] (vi)  $X_{56}$  é G;

- [00650] (vii)  $X_{57}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, H, K, L, M, N, R, V, W, e Y;
- [00651] (viii)  $X_{58}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, e L;
- [00652] (ix)  $X_{59}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em H, N, e Q;
- [00653] (b)  $X_{60}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em C, E, I, L, M, e V; e
- [00654] (c) (i)  $X_{61}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em I e V;
- [00655] (ii)  $X_{62}$  é C, F, I, L, M, T, V, W, e Y;
- [00656] (iii)  $X_{63}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, e V;
- [00657] (iv)  $X_{64}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, e Y;
- [00658] (v)  $X_{65}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, S, T, e W;
- [00659] (vi)  $X_{66}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, I, V, W, e Y;
- [00660] (vii)  $X_{67}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em F, H, I, L, M, V, W, e Y;
- [00661] (viii)  $X_{68}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, C, F, G, I, K, L, M, T, V, e W;
- [00662] (ix)  $X_{69}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em W e Y; e
- [00663] (x)  $X_{70}$  é selecionado a partir do grupo consistindo em A, G, K, L, M, P, Q, e R.
- [00664] 94. O polipeptídeo da modalidade 92, em que:
- [00665] (i)  $X_{51}$  é S;
- [00666] (ii)  $X_{52}$  é L;

- [00667] (iii) X<sub>53</sub> é P;
- [00668] (iv) X<sub>54</sub> é H;
- [00669] (v) X<sub>55</sub> é Q;
- [00670] (vi) X<sub>56</sub> é G; e
- [00671] (vii) X<sub>57</sub> é K;
- [00672] (viii) X<sub>58</sub> é A; e
- [00673] (ix) X<sub>59</sub> é N;
- [00674] (b) X<sub>60</sub> é V; e
- [00675] (c) (i) X<sub>61</sub> é V;
- [00676] (ii) X<sub>62</sub> é T;
- [00677] (iii) X<sub>63</sub> é D;
- [00678] (iv) X<sub>64</sub> é T;
- [00679] (v) X<sub>65</sub> é G;
- [00680] (vi) X<sub>66</sub> é Y;
- [00681] (vii) X<sub>67</sub> é L;
- [00682] (viii) X<sub>68</sub> é K;
- [00683] (ix) X<sub>69</sub> é Y; e
- [00684] (x) X<sub>70</sub> é K.
- [00685] 95. O polipeptídeo da modalidade 1 ou 2, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% idênticas às regiões de alça sem BC, DE, e FG de SEQ ID NO: 118, 273, 281, ou 331.
- [00686] 96. O polipeptídeo da modalidade 1 ou 2, em que a sequência de aminoácido das alças BC, DE, ou FG é pelo menos 80% idênticas a qualquer uma de SEQ ID NOs: 7-38, 39-45, e 46-79, respectivamente.
- [00687] 97. O polipeptídeo da modalidade 1, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, ou 99% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 80-123, 228-239, 252-273, 281, e 331.

[00688] 98. O polipeptídeo da modalidade 97, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, ou 99% idêntica a SEQ ID NO: 331.

[00689] 99. O polipeptídeo da modalidade 97, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, ou 99% idêntica a SEQ ID NO: 273.

[00690] 100. O polipeptídeo da modalidade 1, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 80-123, 228-239, 252-273, 281, e 331.

[00691] 101. O polipeptídeo da modalidade 100, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido estabelecida em SEQ ID NO: 331.

[00692] 102. O polipeptídeo da modalidade 101, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido estabelecida em SEQ ID NO: 273.

[00693] 103. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o sítio de ligação a Adeptina sobre a miostatina é descontínuo.

[00694] 104. O polipeptídeo da modalidade 103, em que o polipeptídeo se liga a uma região dentro de aminoácidos 56-66.

[00695] 105. O polipeptídeo da modalidade 103, em que o polipeptídeo se liga a uma região dentro de aminoácidos 85-101.

[00696] 106. O polipeptídeo da modalidade 103, em que o polipeptídeo se liga a uma região dentro de aminoácidos 85-101 e 56-66 of SEQ ID NO: 3.

[00697] 107. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o polipeptídeo não compete para ligação a miostatina com ActRIIB.

[00698] 108. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades

precedentes, em que o polipeptídeo competes for binding to myostatin with ALK4 e/ou ALK5.

[00699] 109. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades precedentes, adicionalmente compreendendo uma ou mais porções farmacocinéticas (PK) selecionadas a partir do grupo consistindo em polietileno glicol, ácido siálico, Fc, fragmento Fc, transferrina, albumina do soro, uma albumina do soro ligando proteína, e uma imunoglobulina sérica ligando proteína.

[00700] 110. O polipeptídeo da modalidade 109, em que a porção PK e o polipeptídeo são ligados via pelo menos uma ligação dissulfureto, uma ligação de peptídeo, um polipeptídeo, um açúcar polimérico ou uma porção de polietileno glicol.

[00701] 111. O polipeptídeo da modalidade 109, em que a porção PK e o polipeptídeo são ligados via um ligante com uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 181-227.

[00702] 112. O polipeptídeo da modalidade 109, em que the albumina do soro ligando proteína compreende o décimo domínio tipo III de fibronectina (<sup>10</sup>Fn3).

[00703] 113. O polipeptídeo da modalidade 109, em que o domínio <sup>10</sup>Fn3 liga HSA.

[00704] 114. O polipeptídeo da modalidade 109, em que a porção PK é Fc.

[00705] 115. O polipeptídeo da modalidade 114, em que o Fc está no N-terminal do polipeptídeo.

[00706] 116. O polipeptídeo da modalidade 115, em que the Fc é no C-terminal do polipeptídeo.

[00707] 117. O polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 114-116, em que o polipeptídeo forma um dímero.

[00708] 118. O polipeptídeo da modalidade 109, em que a porção PK

é polietileno glicol.

[00709] 119. Uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo de qualquer uma das modalidades anteriores, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[00710] 120. A composição da modalidade 118, em que a composição é essencialmente livre de endotoxina.

[00711] 121. Uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica o polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 1-116.

[00712] 122. A molécula isolada de ácido nucleico da modalidade 121, em que a molécula de ácido nucleico tem uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 124-167, 240- 251, e 284-305.

[00713] 123. Um vetor de expressão compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 1-116.

[00714] 124. Uma célula que compreende um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 1-115.

[00715] 125. Um método de produção de um polipeptídeo de ligação de miostatina, compreendendo a cultura da célula da modalidade 124, sob condições adequadas para a expressão do polipeptídeo, e purificação do polipeptídeo.

[00716] 126. Um método de atenuar ou inibir uma doença ou um distúrbio relacionado com a miostatina em um indivíduo que compreende a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo ou composição de acordo com qualquer uma das modalidades 1-120.

[00717] 127. O processo da modalidade 126, em que a doença ou o distúrbio é selecionado a partir do grupo que consiste em: distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica, doença pulmonar obstrutiva congestiva, insuficiência cardíaca crônica, câncer, AIDS, insuficiência renal, doença renal crônica, uremia, artrite reumatóide, sarcopenia,

perda de massa muscular devido ao repouso absoluto prolongado, lesão da medula espinhal, acidente vascular cerebral, fratura óssea, envelhecimento, diabetes, obesidade, hiperglicemia, caquexia, osteoartrite, osteoporose, enfarte do miocárdio e fibrose.

[00718] 128. Um método de atenuar ou inibir a disfunção associada com a degeneração ou perda de músculos em um indivíduo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo ou composição de qualquer uma das modalidades 1-120.

[00719] 129. O processo da modalidade 128, em que o distúrbio é selecionado a partir do grupo consistindo em distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica, doença pulmonar obstrutiva congestiva, insuficiência cardíaca crônica, câncer, AIDS, caquexia, insuficiência renal, doença renal crônica, uremia, artrite, sarcopenia, perda de massa muscular devido ao repouso absoluto prolongada, lesão da medula espinhal, lesão traumática, acidente vascular cerebral, fratura do osso, e o envelhecimento.

[00720] 130. O processo da modalidade 129, em que a doença é a distrofia muscular.

[00721] 131. O processo da modalidade 128, em que a administração do polipeptídeo ao indivíduo resulta em pelo menos um dos seguintes efeitos biológicos:

[00722] um aumento da massa muscular;

[00723] um aumento no número de células do músculo;

[00724] um aumento do tamanho das células musculares; e

[00725] um aumento na força muscular.

[00726] 132. Um método de atenuar ou inibir um distúrbio metabólico em um indivíduo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo ou composição de qualquer uma das modalidades 1-120.

[00727] 133. O processo da modalidade 132, em que o indivíduo tem uma doença ou um distúrbio selecionado a partir do grupo que consiste

em diabetes, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, resistência à insulina, metabolismo de glicose deficiente, obesidade, e síndrome metabólica.

[00728] 134. O processo da modalidade 132, em que a doença ou o distúrbio é a diabetes do tipo II.

[00729] 135. O processo da modalidade 134, que adicionalmente compreende a administração de uma segunda composição terapêutica para o tratamento de diabetes.

[00730] 136. O método de qualquer uma das modalidades 131-135, em que a administração do polipeptídeo ao indivíduo resulta em pelo menos um dos seguintes efeitos biológicos:

[00731] um aumento na sensibilidade à insulina;

[00732] um aumento na captação de glicose pelas células no indivíduo;

[00733] uma diminuição nos níveis de glicose no sangue; e

[00734] uma diminuição na gordura corporal.

[00735] 137. Um método para aumentar a massa muscular magra em um indivíduo, que compreende administrar uma quantidade eficaz do polipeptídeo ou composição de qualquer uma das modalidades 1-120.

[00736] 138. Um método de aumentar a proporção de massa muscular magra para gorda em um indivíduo, que compreende administrar uma quantidade eficaz do polipeptídeo ou composição de qualquer uma das modalidades 1-120.

[00737] 139. Um kit que compreende o polipeptídeo ou composição de qualquer uma das modalidades 1-120, e instruções para utilização.

140. Um método de detecção ou medição da miostatina numa amostra que compreende contatar a amostra com o polipeptídeo de qualquer uma das modalidades 1-117, e detectar ou medir a ligação do polipeptídeo a miostatina.

## REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende o décimo domínio tipo III de fibronectina ( $^{10}\text{Fn3}$ ), caracterizado pelo fato de que:

(i) o polipeptídeo se liga à miostatina com um  $K_D$  inferior a 500 nM; e

(ii) as sequências de aminoácidos das alças BC, DE e FG do domínio  $^{10}\text{Fn3}$  compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 34, 39 e 75, respectivamente, em que uma alça das alças BC, DE e FG do domínio  $^{10}\text{Fn3}$  tem opcionalmente uma substituição de aminoácido em relação às respectivas alças BC, DE e FG de SEQ ID NO: 34, 39 e 75.

2. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

(i) a serina na posição 3 da alça BC (SEQ ID NO: 34) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, T, V, W, e Y;

(ii) a leucina na posição 4 da alça BC (SEQ ID NO: 34) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de M e V;

(iii) a prolina na posição 5 da alça BC (SEQ ID NO: 34) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, D, E, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, e Y;

(iv) a histidina na posição 6 da alça BC (SEQ ID NO: 34) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;

(v) a glutamina na posição 7 da alça BC (SEQ ID NO: 34) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, e Y;

(vi) a glicina na posição 8 da alça BC (SEQ ID NO: 34) é

substituída por o aminoácido S;

(vii) a lisina na posição 9 da alça BC (SEQ ID NO: 34) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;

(viii) a alanina na posição 10 da alça BC (SEQ ID NO: 34) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de C, G, L, M, S, e T; ou

(ix) a asparagina na posição 11 da alça BC (SEQ ID NO: 34) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, F, H, P, Q, R, S e Y.

3. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a valina na posição 5 da alça DE (SEQ ID NO: 39) é substituída com uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo de A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, e T.

4. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

(i) a valina na posição 2 da alça FG (SEQ ID NO: 75) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, F, I, L, M, Q, T, W, e Y;

(ii) a treonina na posição 3 da alça FG (SEQ ID NO: 75) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, e Y;

(iii) o ácido aspártico na posição 4 da alça FG (SEQ ID NO: 75) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y;

(iv) a treonina na posição 5 da alça FG (SEQ ID NO: 75) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, e Y;

(v) a glicina na posição 6 da alça FG (SEQ ID NO: 75) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo

de A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, e Y;

(vi) a tirosina na posição 7 da alça FG (SEQ ID NO: 75) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, F, G, H, I, L, M, N, P, S, T, V e W;

(vii) a leucina na posição 8 da alça FG (SEQ ID NO: 75) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, E, F, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;

(viii) a lisina na posição 9 da alça FG (SEQ ID NO: 75) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;

(ix) a tirosina na posição 10 da alça FG (SEQ ID NO: 75) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de F ou W; ou

(x) a lisina na posição 11 da alça FG (SEQ ID NO: 75) é substituída por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V ou W.

5. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as alças BC, DE e FG compreendem, respectivamente, as sequências de aminoácidos SEQ ID NO: 34, 39, e 75.

6. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NOs: 331, 273, 281 ou 118.

7. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 331.

8. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 273.

9. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 281.

10. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que se liga a uma região dentro dos aminoácidos 56-66 de SEQ ID NO: 3.

11. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que se liga a uma região dentro dos aminoácidos 85-101 e 56-66 de SEQ ID NO: 3.

12. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo não compete para ligação a miostatina com ActRIIB e/ou o polipeptídeo compete para ligação a miostatina com ALK4 e/ou ALK5.

13. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma ou mais porções farmacocinéticas (PK) selecionadas a partir do grupo que consiste em polietileno glicol, ácido siálico, Fc, fragmento Fc, transferrina, albumina do soro, uma albumina do soro de ligação a proteína, e uma imunoglobulina sérica de ligação a proteína.

14. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a fração PK e o polipeptídeo estão ligados por meio de um ligante com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 187.

15. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a fração PK é um Fc.

16. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 269.

17. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 273.

18. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, e um veículo.

19. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 296 ou SEQ ID NO: 305.

20. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico isolada, com definida na reivindicação 19, em que a referida célula hospedeira é uma célula procariota, bacteriana ou levedura.

21. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, ou composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que é para uso em um método de tratamento de um distúrbio muscular, neurológico ou metabólico que está associado com atrofia muscular e/ou atrofia muscular ou um distúrbio degenerativo ósseo.

22. Polipeptídeo ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a administração do polipeptídeo ao indivíduo resulta em pelo menos um dos seguintes efeitos biológicos:

- (a) um aumento na massa ou volume muscular;
- (b) um aumento no número de células musculares;
- (c) um aumento no tamanho das células musculares; e
- (d) um aumento da força muscular.

23. Polipeptídeo ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem miopatia ou neuropatia.

24. Polipeptídeo ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem uma distrofia muscular.

25. Polipeptídeo ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem distrofia muscular de Duchenne.

26. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, ou composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de um distúrbio metabólico selecionado de obesidade, diabetes mellitus tipo II, distúrbios associados a diabetes, síndrome metabólica e hiperglicemia.

27. Polipeptídeo ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a administração do polipeptídeo ao indivíduo resulta em pelo menos um dos seguintes efeitos biológicos:

- (a) um aumento na sensibilidade à insulina;
- (b) um aumento na captação de glicose pelas células no indivíduo;
- (c) uma diminuição nos níveis de glicose no sangue; e
- (d) diminuição da gordura corporal.

28. Método de detecção ou medição da miostatina em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende contatar a amostra com o polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, e detectar ou medir a ligação do polipeptídeo a miostatina

29. Uso de um polipeptídeo ou composição, como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento adequado para tratar uma doença ou distúrbio relacionado com miostatina.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o medicamento é adequado para tratar uma doença ou distúrbio relacionado a miostatina através de pelo menos um dos seguintes efeitos biológicos:

- (a) um aumento da massa muscular;

- (b) um aumento no número de células musculares;
- (c) um aumento do tamanho das células musculares; e
- (d) um aumento na força muscular.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o medicamento é adequado para tratar uma doença ou distúrbio relacionado com miostatina através de pelo menos um dos seguintes efeitos biológicos:

- (a) um aumento na sensibilidade à insulina;
- (f) um aumento na captação de glicose pelas células do indivíduo;
- (g) uma diminuição dos níveis de glicose no sangue; e
- (h) uma diminuição na gordura corporal.

32. Uso de um polipeptídeo ou composição, como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento indicado para aumentar a massa muscular.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio relacionado com miostatina é uma desordem do neurônio motor, uma desordem neuromuscular ou uma desordem neurológica.

34. Uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio relacionado com miostatina é distrofia muscular de Duchene.





**GRGV**

*Fig. 3*



*Fig. 4*

**DAPRGLA**  
**EAS**  
**WV**  
**PAGL**  
**KG**  
**GLA**  
**RA**

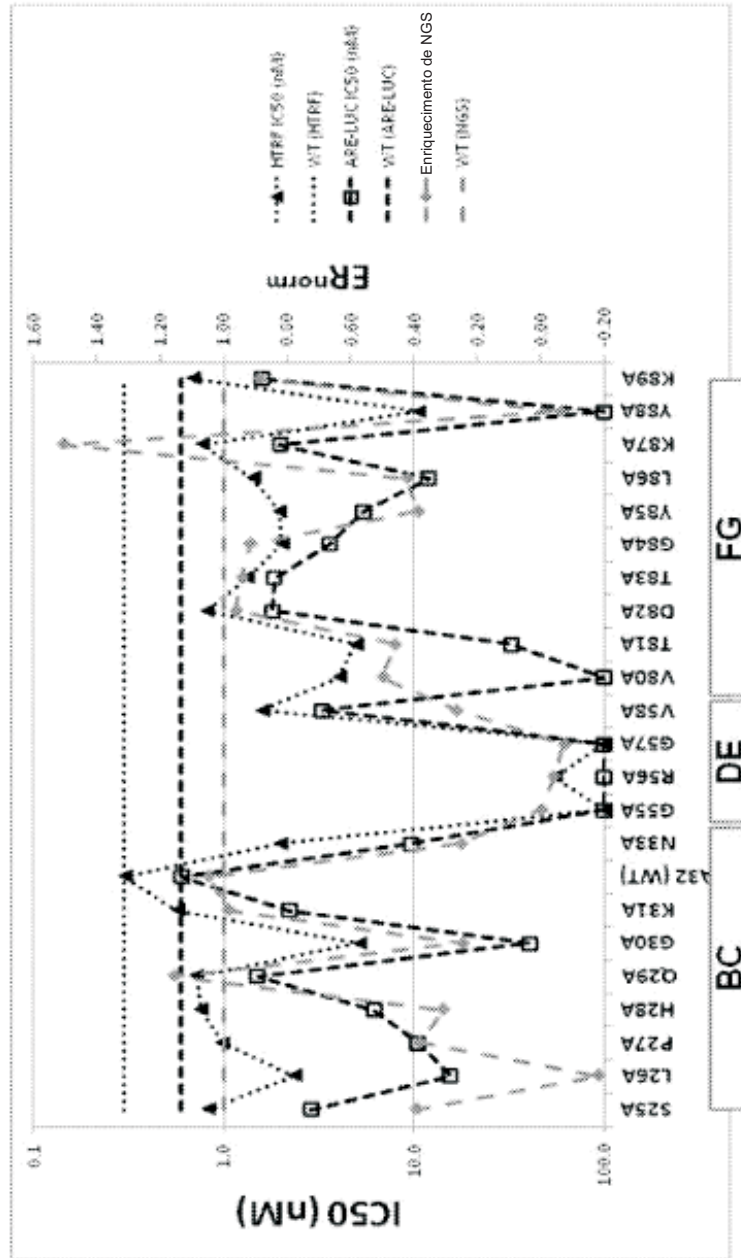
*Fig. 5*

V  
P  
E  
L  
V  
G  
M  
R  
G  
N  
S  
T

*Fig. 6*

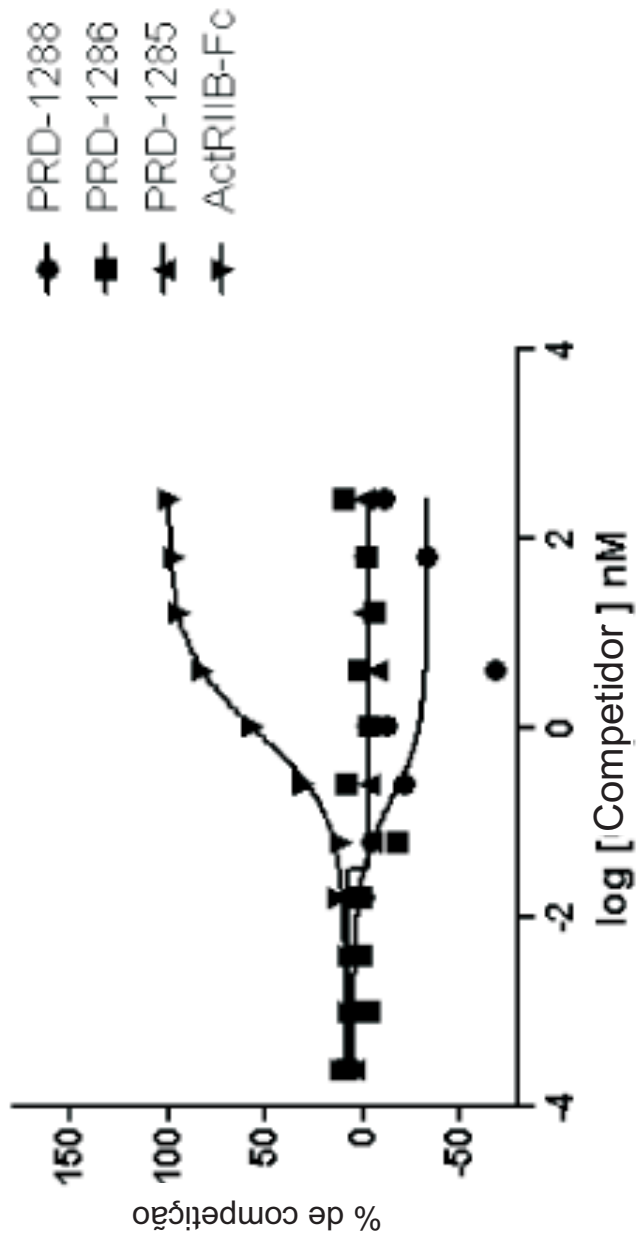
| E R D G P V H E D  
↓ D R D G M V T W  
V Y I T T S S L G

*Fig. 7*





ELISA de competição de ActRIIB de Miostatina



**Fig. 10**

Ensaio ARE-Luc de Miostatina

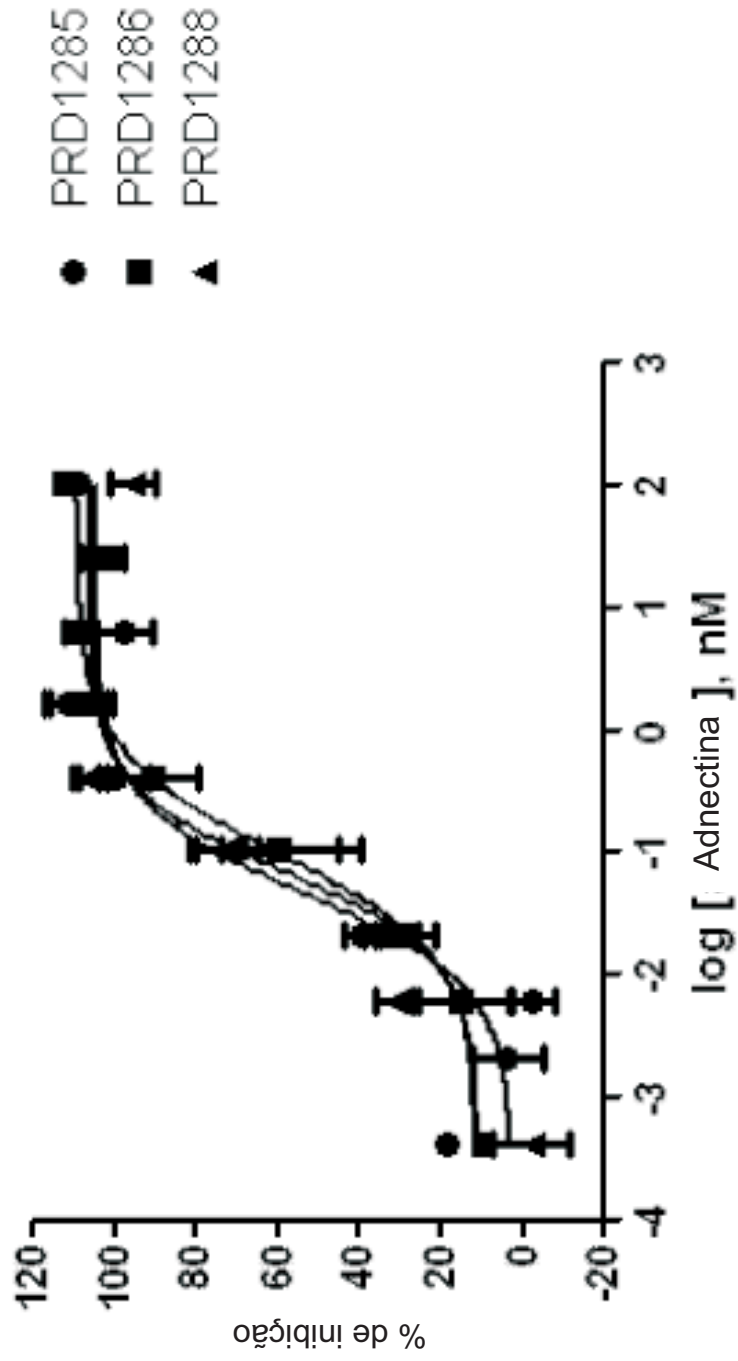
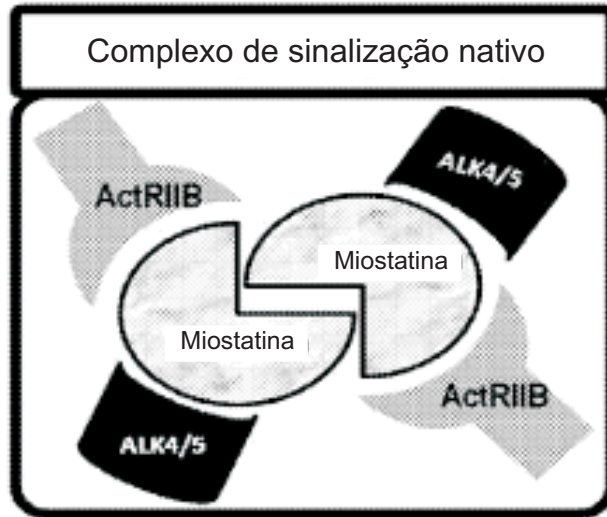
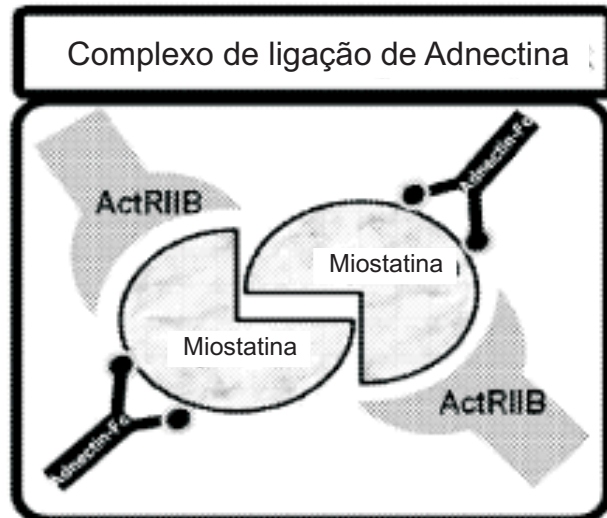


Fig. 11

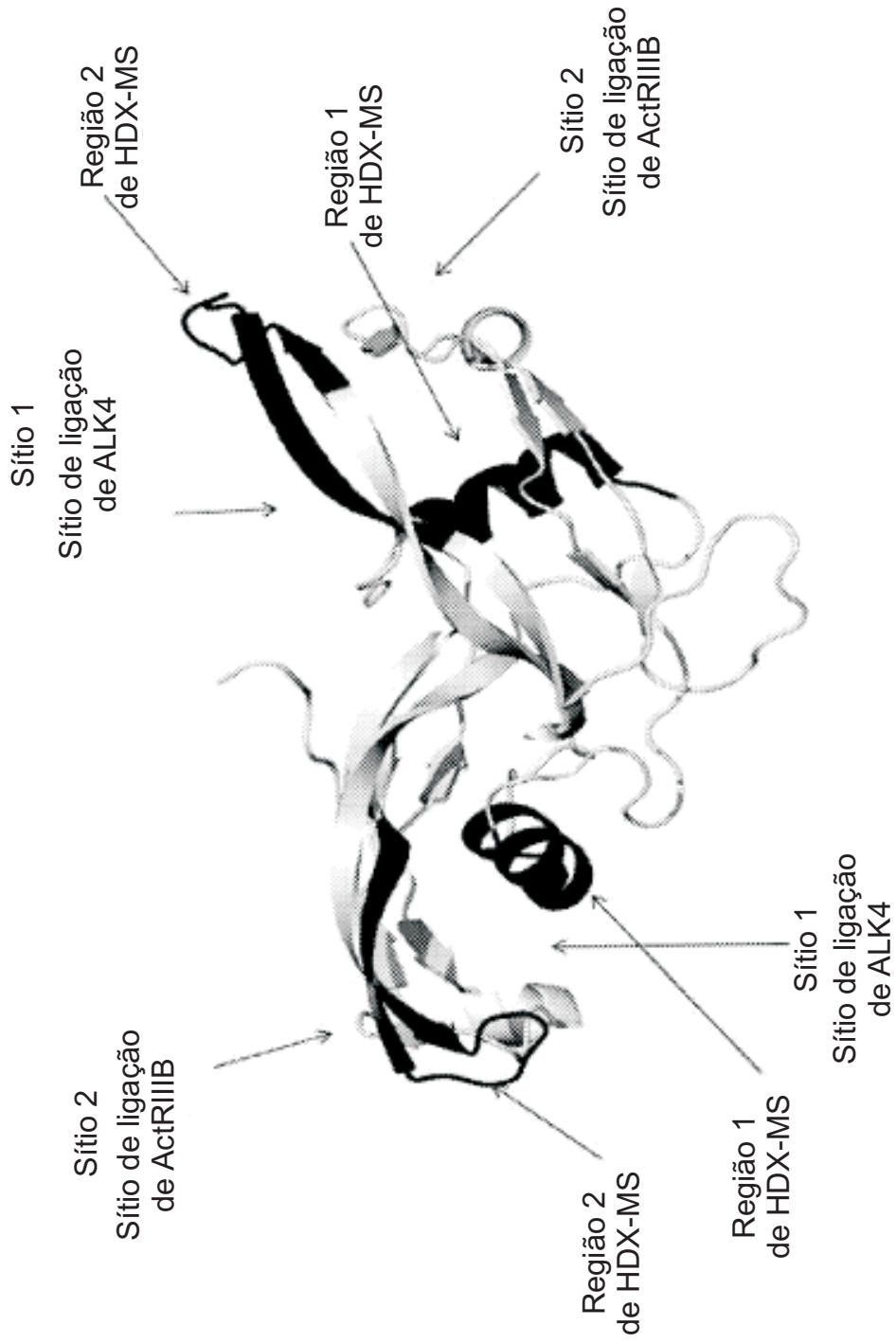
**A.**



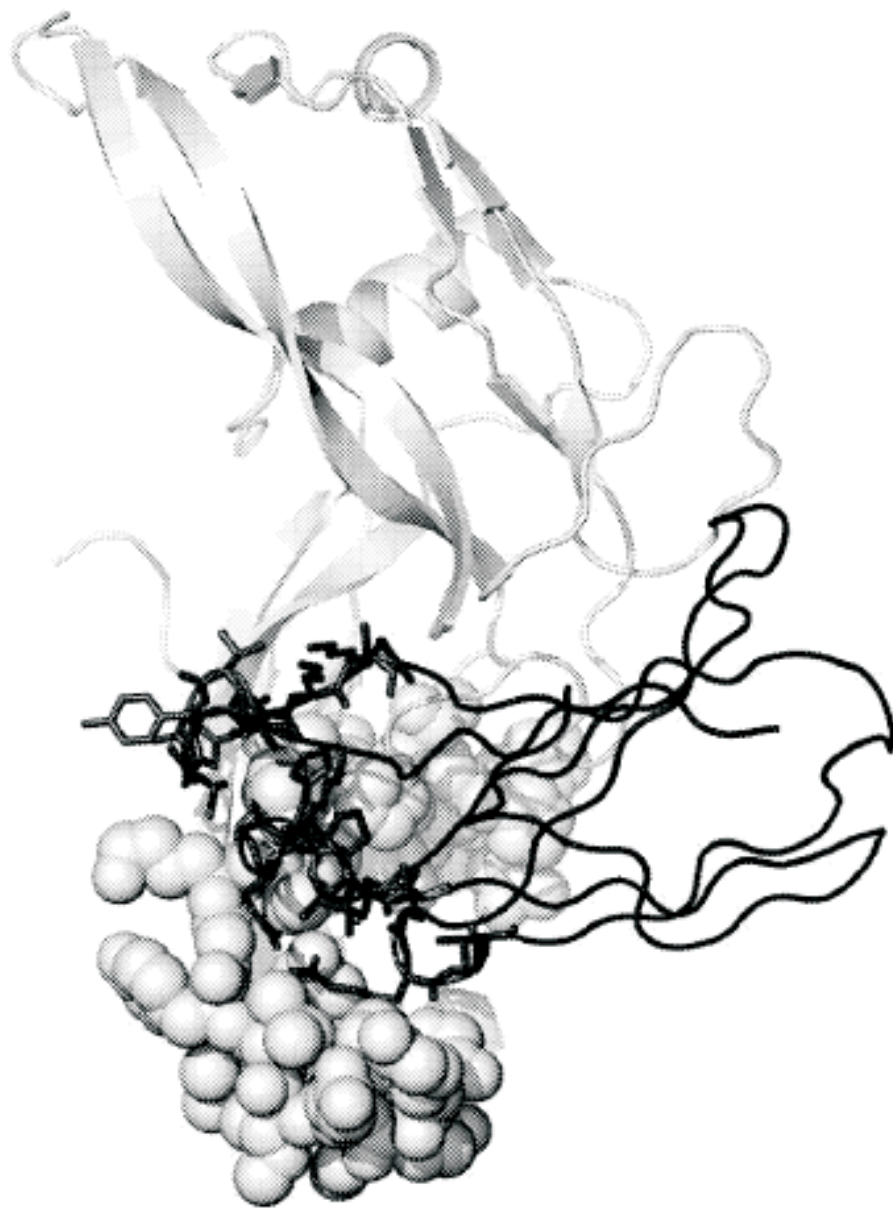
**B.**



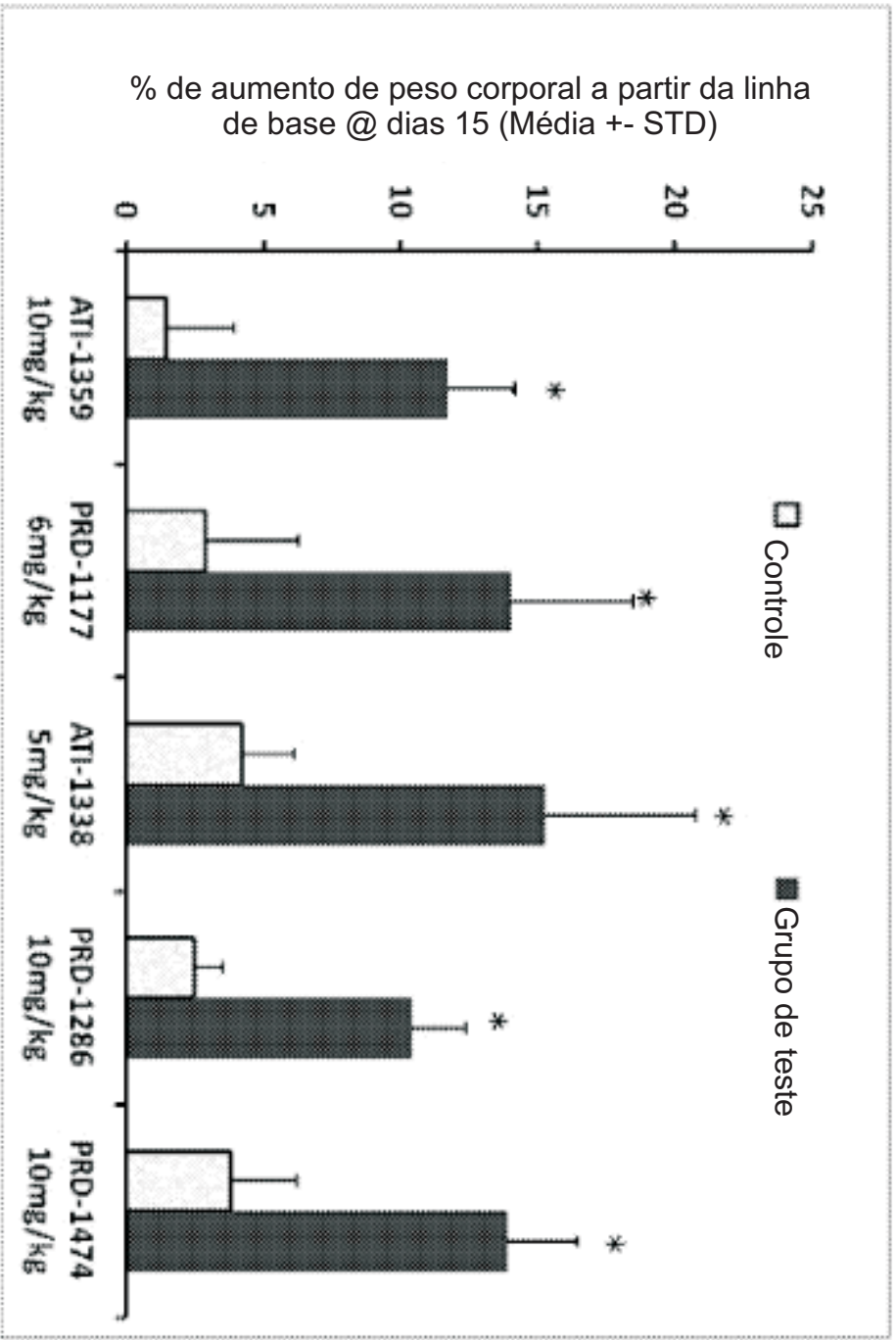
**Fig. 12**



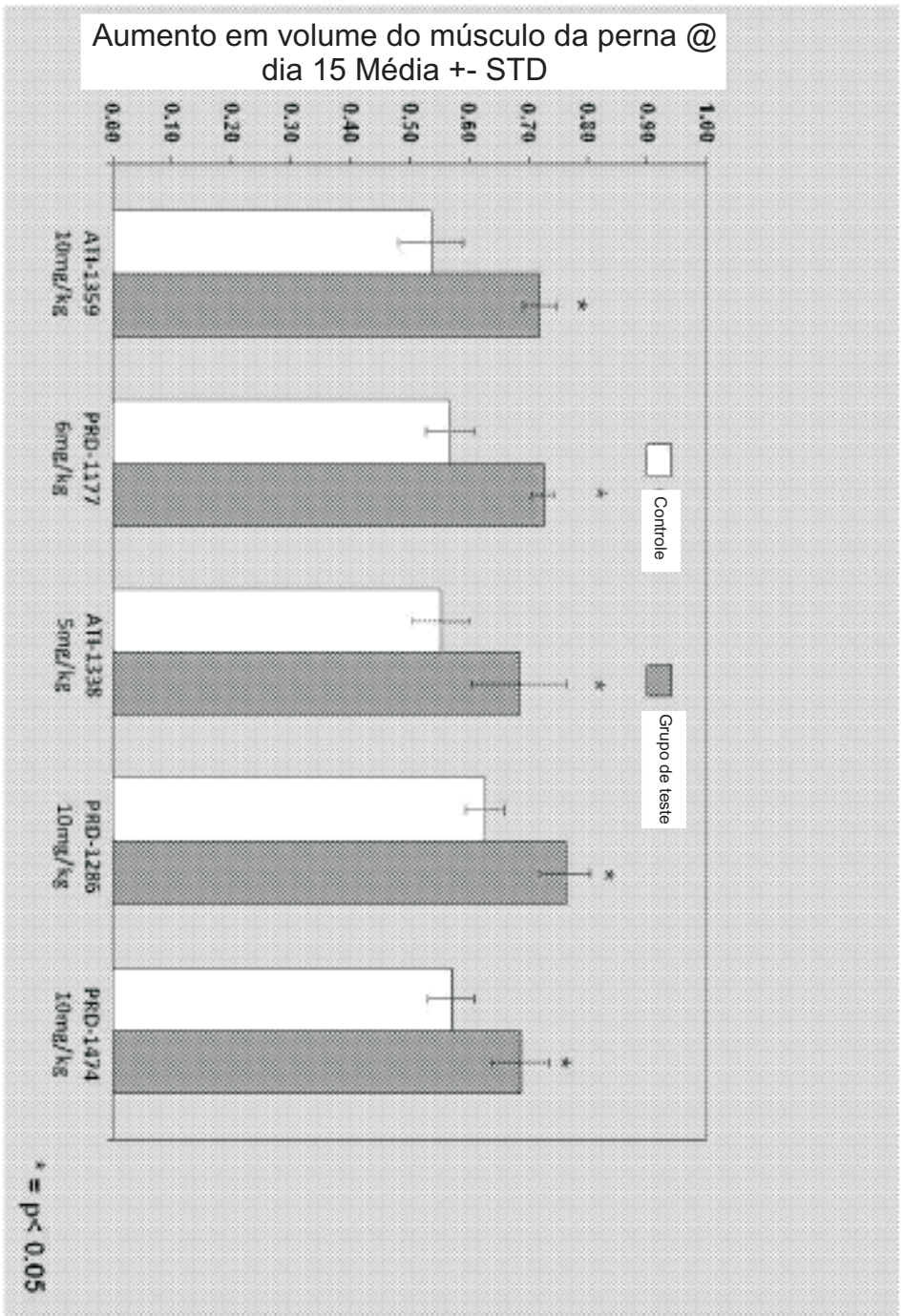
**Fig. 13A**



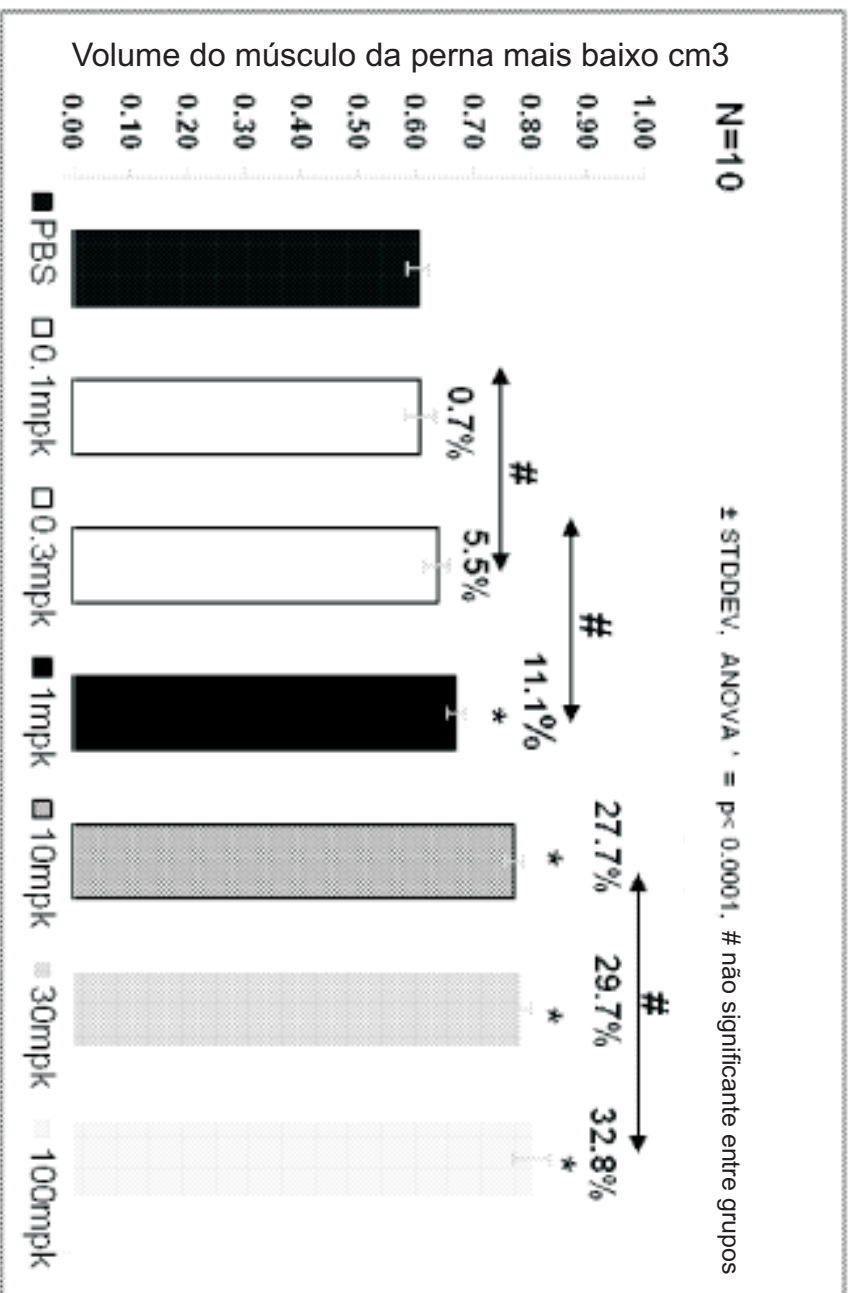
**Fig. 13B**



**Fig. 14**



**Fig. 15**



**Fig. 16**