

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**VÍRUS ENVELOPADO RESISTENTE À INATIVAÇÃO PELO COMPLEMENTO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER**".

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0001] A Listagem de Sequências depositada eletronicamente na forma de um arquivo de texto Annex C/ST.25 e que carrega referência de depósito 21003-PCT constitui uma parte da divulgação.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

[0002] Vírus oncolíticos foram testados como agentes para o tratamento de cânceres através da infecção e da destruição de células tumorais. Estes vírus oncolíticos incluem Vírus da Doença de Newcastle, Adenovírus, vírus Sindbis, vírus Vaccinia, vírus Herpes etc. O Vírus da Doença de Newcastle (NDV) mostrou um grande potencial de encolhimento de tumor em pacientes com câncer devido a sua propriedade única de replicação preferencial em células tumorais e de lise das mesmas, presumivelmente graças ao fato que a maioria das células tumorais tem uma via de interferon deficiente (Pecora et al., 2002; Laurie et al., 2006; Lorence et al., 2007). Apesar dos resultados clínicos promissores preliminares, o NDV como um agente terapêutico para câncer possui uma deficiência: inevitavelmente a maioria das partículas de NDV será destruída pelo sistema imunológico inato do paciente, a via do complemento alternativa, assim que os vírus entrarem no corpo do paciente.

[0003] O sistema do complemento faz parte do sistema imunológico inato e adaptativo (revisado por Volanakis, J.E., 1998. Chapter 2. In *The Human Complement System in Health and Disease*. Edited by J. E. Volanakis, and M.M. Frank. Marcel Dekker, Inc., New York pp 9-32). O complemento desempenha uma função importante na morte microbiana e para o transporte e a eliminação de complexos imunológicos. Muitos dos produtos de ativação do sistema do complemento também estão

associados com funções pró-inflamatórias ou imunorreguladoras. O sistema do complemento consiste de proteínas do plasma e associadas às membranas que são organizadas em três cascatas de ativação enzimática: a clássica, a da lectina e as vias alternativas. Todas as três vias podem levar à formação do complexo do complemento terminal/complexo de ataque à membrana (TCC/MAC) e um arranjo de produtos biologicamente ativos.

[0004] As células e os órgãos humanos possuem uma família de proteínas reguladoras do complemento ligadas à membrana para proteger os mesmos da lise homóloga mediada pelo complemento. Estas proteínas reguladoras do complemento incluem CD55 (fator de aceleração do decaimento, DAF), CD46 (proteína de cofator de membrana, MCP), CD35 (receptor do complemento 1, CR1) e CD59 (inibidor de membrana de lise reativa) (Carroll et al., 1988; Rey-Campos et al., 1988; Lublin et al., 1989; Morgan et al., 1994; Kim e Song, 2006).

[0005] CD55 é uma proteína ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) e se liga a uma membrana plasmática da célula através de um grupamento glicolípídico (ancorador de GPI) em seu C-terminal. As proteínas ancoradas a GPI tal como CD55 podem ser endocitadas e degradadas ou clivadas e liberadas da membrana plasmática da célula (Censullo e Davitz, 1994a, 1994b; Turner 1994). Por exemplo, as proteínas ancoradas a GPI incluindo CD55 podem ser liberadas da superfície da célula através da ação de fosfolipases C e D específicas para GPI (Turner 1994). Provavelmente estas atividades enzimáticas controlam o catabolismo das proteínas ancoradas a GPI e regulam a expressão na superfície celular destas proteínas (Censullo e Davitz, 1994b).

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0006] Esta invenção fornece uma proteína de fusão recombinante que compreende: (a) uma sequência peptídica de CD55, (b) uma sequência de ligação C-terminal à sequência de CD55, (c) um domínio

transmembrana C-terminal à sequência de ligação e (d) um domínio intracelular C-terminal ao domínio transmembrana, em que a proteína de fusão não contém um ancorador de GPI. Esta invenção fornece também ácidos nucleicos e vetores de expressão que codificam a proteína, as células que expressam a proteína, os vírus envelopados que incorporam a proteína sobre a membrana viral, composições farmacêuticas que compreendem o vírus que incorpora proteína desta invenção, bem como métodos de tratamento e usos do vírus.

[0007] Esta invenção se baseia, em parte, na descoberta de que o vírus que expressa uma proteína de fusão de acordo com esta invenção era resistente à inativação pelo soro humano normal, que é evidenciada por uma taxa de recuperação maior comparada com a de vírus que não expressa a proteína de fusão. O vírus envelopado oncolítico produzido pelas células engenheiradas da invenção que incorporam um inibidor do complemento na forma de uma proteína de fusão recombinante sobre a membrana viral é um agente terapêutico para câncer melhor e fornece melhores resultados clínicos para pacientes com câncer quando comparado com o vírus correspondente que não possui um inibidor do complemento sobre a membrana viral, devido a sua capacidade de sobrevivência na circulação do soro humano antes de entrar em um tumor. Os benefícios são triplos: 1) o vírus oncolítico pode ser produzido em um sistema de cultura de células em um biorreator; 2) menos partículas virais são necessárias para atingir a mesma eficácia terapêutica quando comparado com o vírus oncolítico original produzido em ovos de galinha; 3) a infusão de menos partículas virais a um paciente com câncer pode reduzir os efeitos colaterais associados às grandes quantidades de partículas virais tal como tempestade de citocinas ou efeitos relacionadas a impurezas.

[0008] Outros que estudaram os efeitos da proteína reguladora do complemento CD55 sobre a proteção do Vírus da Doença de Newcastle

(NDV) (Biswas et al., 2012; Rangaswamy et al., 2016) utilizaram CD55 não modificado nativo, que inclui um ancorador de glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Em contraste, a proteína de fusão desta invenção omite o ancorador de GPI. Sem desejar ficar limitado à teoria, acredita-se que a omissão de um ancorador de GPI alterou a dinâmica do catabolismo de CD55 sobre a superfície celular. A proteína de fusão desta invenção foi capaz de suportar condições de inativação mais rigorosas que aquelas utilizadas por Biswas e Rangaswamy. Biswas utilizou 5 a 10% de soro humano normal e Rangaswamy utilizou 0,3 a 5% de soro humano normal em seus ensaios de inativação. O exemplo a seguir utilizou 40% de soro humano normal para conduzir o ensaio de inativação sobre o NDV que incorporou a proteína de fusão recombinante.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0009] Figura 1. Sequência do mapa de construção de expressão em célula de mamífero que codifica uma proteína de fusão inibidora do complemento recombinante que consiste de a peptídeo sinal de secreção, quatro repetições consenso curtas (SCR) de CD55, um ligante flexível, um domínio transmembrana de CD8 e um domínio intracelular de CD8 truncado, seguidos pelo marcador selecionável IRES-neo e um sinal de poliadenilação sintético (polyA).

[00010] Figura 2. Diagrama que ilustra a orientação da proteína de fusão inibidora do complemento maturada sobre a membrana celular de DF1 engenheirada ou sobre a membrana de NDV modificada.

[00011] Figura 3. Expressão em superfície celular de uma proteína de fusão inibidora do complemento recombinante. Análise de citometria de fluxo para expressão da proteína de fusão por um anticorpo específico para CD55. O histograma à esquerda representa as células DF1 naïve como um controle negativo. O histograma à direita representa as células DF1 que expressam estavelmente a SEQ ID NO:2 (número de clone de célula 8).

[00012] Figura 4. Ensaio de citotoxicidade do NDV produzido pelas células DF1 engenheiradas (Clone número 8) incorporadas com a proteína de fusão inibidora do complemento nas linhagens de células tumorais.

[00013] Figura 5. Sequência de Aminoácidos de uma proteína de fusão inibidora do complemento recombinante que consiste de peptídeo sinal de secreção, quatro repetições consenso curtas (SCR) de CD55, um ligante flexível, um domínio transmembrana de CD8 e um domínio intracelular de CD8 truncado. (SEQ ID NO:2)

Sublinhado Duplo indica Peptídeo sinal de secreção

Caractere regular indica SCR de CD55

Sublinhado indica (G4S1)<sub>3</sub> Ligante

**Negrito** indica o domínio transmembrana de CD8

*Itálico* indica o domínio intracelular de CD8 truncado

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00014] De acordo com a proteína de fusão desta invenção qualquer sequência peptídica de CD55 pode ser utilizada para sequência (a). Em uma modalidade a sequência peptídica de CD55 é uma sequência peptídica de CD55 humana. A sequência peptídica de CD55 compreende preferencialmente quatro repetições consenso curtas (SCR) de CD55. Qualquer ligante flexível pode ser utilizado para sequência (b), por exemplo um ligante flexível convencional conhecido no campo. Em uma modalidade é utilizado um ligante G4S1, preferencialmente um ligante (G4S1)<sub>3</sub>. Qualquer domínio transmembrana pode ser utilizado para sequência (c), por exemplo, um domínio transmembrana convencional conhecido no campo. Em uma modalidade o domínio transmembrana é um domínio transmembrana de CD8. Qualquer domínio intracelular pode ser utilizado para sequência (d), por exemplo um domínio intracelular convencional. Em uma modalidade o domínio transmembrana é um

domínio transmembrana de CD8, preferencialmente um domínio transmembrana de CD8 truncado.

[00015] A proteína de fusão desta invenção pode compreender ainda um peptídeo sinal de secreção N-terminal à sequência (a). De acordo com o processo preferido desta invenção a proteína de fusão é inicialmente expressa com o peptídeo sinal. O peptídeo sinal direciona a proteína de fusão recém-sintetizada para o retículo endoplasmático (ER), onde o peptídeo sinal é clivado pela peptidase sinal. A SEQ ID NO:2 é um exemplo de proteína de fusão desta invenção que possui um peptídeo sinal N-terminal. A SEQ ID NO:3 é um exemplo de proteína de fusão desta invenção que não possui um peptídeo sinal N-terminal.

[00016] De acordo com a proteína de fusão desta invenção pode haver opcionalmente um espaçador de um ou mais aminoácidos entre o peptídeo sinal N-terminal e a sequência (a), entre a sequência (a) e a sequência (b), entre a sequência (b) e a sequência (c), entre a sequência (c) e a sequência (d), entre quaisquer duas das mesmas, entre quaisquer três das mesmas ou entre todas as quatro. Em uma modalidade desta invenção não há espaçador entre o peptídeo sinal N-terminal e a sequência (a) ou, em outras palavras, o peptídeo sinal N-terminal está covalentemente ligado à sequência (a) através de uma única ligação peptídica. Em outra modalidade há um espaçador entre o peptídeo sinal N-terminal e a sequência (a).

[00017] Em uma modalidade desta invenção não há espaçador entre a sequência (a) e a sequência (b) ou, em outras palavras, a sequência (a) está covalentemente ligada à sequência (b) através de uma única ligação peptídica. Em outra modalidade há um espaçador entre a sequência (a) e a sequência (b). Em uma modalidade desta invenção não há espaçador entre a sequência (b) e a sequência (c) ou, em outras palavras, a sequência (b) está covalentemente ligada à sequência (c) através de uma única ligação peptídica. Em outra modalidade há um

espaçador entre a sequência (b) e a sequência (c). Em uma modalidade desta invenção não há espaçador entre a sequência (c) e a sequência (d) ou, em outras palavras, a sequência (c) está covalentemente ligada à sequência (d) através de uma única ligação peptídica. Em outra modalidade há um espaçador entre a sequência (c) e a sequência (d). Em princípio não há limitação sobre o tamanho dos espaçadores.

[00018] CD55 contém quatro repetições consenso curtas extracelulares (SCR), uma região rica em Ser/Thr/Pro (STP) e um domínio de ancoragem de GPI. De acordo com a proteína de fusão desta invenção o domínio de ancoragem de GPI é omitido. A região rica em STP pode estar presente ou ausente. Uma modalidade da sequência que codifica a proteína de fusão desta invenção compreende ainda um sinal de poliadenilação C-terminal à terceira sequência que codifica a sequência peptídica. Um sinal de poliadenilação (Poly A) pode ser qualquer Poly A.

[00019] Esta invenção fornece um ácido nucleico que codifica a proteína descrita acima. Em uma modalidade o ácido nucleico é DNA. Este pode conter opcionalmente um ou mais íntrons, entre as sequências que codificam o peptídeo sinal e a sequência (a), entre a sequência (a) e a sequência (b), entre a sequência (b) e a sequência (c), entre a sequência (c) e a sequência (d) ou em outro local. Em uma modalidade desta invenção o ácido nucleico codifica uma proteína que possui a sequência SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:3. A SEQ ID NO:1 é um exemplo de um ácido nucleico que codifica uma proteína que possui a sequência SEQ ID NO:2. Devido ao fato de que tripletos de códon de ácidos nucleicos diferentes codificam o mesmo aminoácido, uma relação conhecida como a degeneração do código genético, muitas outras sequências de ácidos nucleicos que codificam uma proteína que possui a sequência SEQ ID NO:2 podem ser facilmente previstas e são incluídas nesta invenção.

[00020] Uma modalidade desta invenção é um vetor de expressão



que compreende o ácido nucleico descrito anteriormente ligado de forma operacional a uma sequência de controle, por exemplo, um promotor. O promotor que controla a proteína de fusão pode ser qualquer promotor e não é limitado a um promotor do CMV. Quando houver um íntron entre o promotor e a sequência que codifica a proteína de fusão, pode ser utilizado qualquer íntron adequado e convencional. Por exemplo, um íntron da  $\beta$ -globina é adequado.

[00021] Esta invenção fornece uma linhagem de células que expressa de forma estável a proteína de fusão desta invenção sobre sua superfície celular. Qualquer linhagem de células convencional para expressão de proteína pode ser utilizada de acordo com esta invenção. Em uma modalidade a linhagem de células é uma linhagem de células de mamífero. Em outra modalidade a linhagem de células é uma linhagem de células que não é de mamífero, por exemplo, uma linhagem de células de fibroblasto embrionário de frango DF-1.

[00022] Esta invenção fornece um vírus envelopado que incorpora a proteína de fusão descrita anteriormente sobre a membrana viral. De acordo com esta invenção qualquer vírus envelopado pode ser utilizado. Em uma modalidade o vírus é um vírus oncolítico, por exemplo, um paramixovírus tal como o Vírus da Doença de Newcastle (NDV). Nos exemplos um inibidor do complemento na forma de uma proteína de fusão recombinante foi incorporado sobre o envelope das partículas de NDV. A proteína de fusão recombinante desta invenção poderia ser utilizada para vírus oncolíticos sem ser o NDV, levando à geração de partículas virais oncolíticas que são mais resistentes à inativação pelo complemento do hospedeiro. O novo inibidor do complemento recombinante na forma de uma proteína de fusão pode ser utilizado para modificar outras células de mamíferos tais como células HeLa para produzir vírus oncolíticos. Os vírus oncolíticos são descritos na Publicação de Patente Internacional No. WO 2000/062735, cujo conteúdo é incorporado aqui

como referência. Nos experimentos cujos resultados são mostrados a seguir, o NDV utilizado foi o PPMK107 descrito na WO 2000/062735.

[00023] O vírus pode ser incorporado em uma composição farmacêutica que compreende o vírus e um veículo farmacêuticamente aceitável. Esta invenção fornece um método para o tratamento de um estado de saúde neoplásico em um indivíduo mamífero, que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade do vírus descrito anteriormente eficiente para tratar o estado de saúde neoplásico. Para tratamento de câncer, o vírus pode ser administrado aos pacientes através de qualquer rota convencional, por exemplo, através de um ou mais injeções intratumorais ou intravenosas. Para administração intratumoral, a faixa de doses pode ser de  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^{12}$  ufp/por tumor. Para administração intravenosa, a faixa de doses pode ser de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^{13}$  ufp/m<sup>2</sup>. ('Ufp' é uma abreviação para 'unidade formadora de placa').

[00024] O vírus oncolítico de acordo com esta invenção também poderia ser engenheirado para incorporar outras moléculas tal como GMCSF para aumentar a eficácia do vírus oncolítico. Em adição, o vírus oncolítico poderia ser parte de uma terapia para câncer de combinação com um inibidor de ponto de verificação tal como molécula anti-PD1 ou anti-PDL1. Ainda, o vírus oncolítico poderia ser parte de uma terapia para câncer de combinação com outros agentes quimioterapêuticos. Os agentes quimioterapêuticos poderiam ser, mas não são limitados a, compostos de camptotecina, por exemplo, irinotecan ou topotecan.

[00025] Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionados neste relatório descritivo são incorporados aqui como referência em sua totalidade no relatório descritivo até a mesma extensão como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado como sendo incorporado aqui como referência. É também incorporada aqui como referência qualquer informação suplementar que foi publicada junto com qualquer uma das

publicações, das patentes e dos pedidos de patentes mencionados anteriormente. Por exemplo, alguns artigos de periódicos são publicados com informação suplementar que está tipicamente disponível online.

[00026] A invenção será melhor entendida com referência aos exemplos a seguir, que ilustram, mas não limitam a invenção descrita aqui.

### EXEMPLOS

#### Exemplo 1:

[00027] Uma versão modificada de CD55 recombinante com quatro repetições consenso curtas (SCR) de CD55 a jusante do peptídeo sinal de secreção seguidas por um ligante flexível (3xG4S1) e um CD8 transmembrana e um domínio intracelular de CD8 truncado (Figura 1). A sequência codificadora foi clonada em uma construção de expressão em mamíferos que possui um promotor do CMV, um íntron sintético que controla a expressão da proteína recombinante. O cassete de expressão também continha um marcador selecionável com fármaco, neomicina fosfotransferase a jusante de IRES. O cassete de expressão gênica terminava com um sinal de poliadenilação sintético. A SEQ ID NO:1 é a sequência de nucleotídeos da construção de expressão em células de mamíferos. A SEQ ID NO:2 representa a sequência de aminoácidos da proteína expressa. Quando expresso sobre a superfície celular de fibroblastos embrionários de frango DF1 ou incorporado na membrana do vírus, o peptídeo sinal é clivado fornecendo a proteína de fusão recombinante madura (SEQ ID NO:3) que possui uma configuração/orientação tal que CD55 SCR fica sobre a parte externa da célula ou da membrana viral, o ligante flexível adjacente à célula ou à membrana viral deve fornecer flexibilidade máxima para SCR de CD55 para exercer sua função biológica, isto é, desativando a C3 convertase que é o regulador central da via do complemento. O ligante flexível é seguido por um domínio transmembrana de CD8 e um domínio intracelular de CD8 truncado.

Exemplo 2:

[00028] A construção de expressão em mamíferos foi transfectada em células de fibroblasto embrionário de frango DF1 através da transfecção mediada por PEI 25K (polietilenoimina, 25 kDa linear, Polysciences, Cat. No. 23966). Setenta e duas horas após a transfecção, as células transfectadas foram selecionadas em 300 µg/mL de G418 (Geneticin®, antibiótico de aminoglicosídeo) para criar uma linhagem de células estável que expressa de forma constitutiva a SEQ ID NO:2. A linhagem de células estável expressava de forma constitutiva a SEQ ID NO:3 sobre sua superfície celular como foi detectado por um anticorpo monoclonal (R&D Systems, Catalog No. MAB20091) que é específico para CD55 humana madura. Como mostrado na Figura 3, a proteína de fusão recombinante foi expressa sobre as células DF1 transfectadas de forma estável com a construção que codifica a proteína de fusão recombinante como foi analisado por citometria de fluxo (Figura 3, o histograma à direita). As células DF1 naïve serviram como um controle negativo (Figura 3, o histograma à esquerda).

Exemplo 3:

[00029] A linhagem de células estável expressando a SEQ ID NO:3 sobre a superfície celular foi infectada com NDV do tipo selvagem que foi produzido partindo dos ovos embrionados de galinha. O vírus foi então titulado na linhagem de células de tumor humano HT1080. Uma quantidade equivalente do vírus (medida por UFP) foi submetida à incubação com 40% de soro humano normal (NHS) e 40% de soro humano normal inativado com calor (iNHS) respectivamente. O vírus que permaneceu ativo após a incubação com o soro humano foi então contado nas células HT1080 através de ensaio de placas. Foi calculada a proporção de vírus recuperado após a incubação com NHS vs iNHS. Como mostrado na Tabela 1, a taxa de recuperação para o vírus produzido em ovos embrionados de galinha era 0,5%, sugerindo que a vasta maioria

das partículas de NDV produzidas pelos ovos de galinha foi inativada mais provavelmente pela via do complemento alternativa humana. Similarmemente, a taxa de recuperação para o vírus produzido pelas células de fibroblasto embrionário de frango DF1 originais era 0,5%. Surpreendentemente, a taxa de recuperação para o vírus produzido partindo das células DF1 não clonais em massa que expressavam de forma estável a SEQ ID NO:3 sobre a superfície celular era 5,8%, mais de 10 vezes o vírus do tipo selvagem. Quando um total de 11 populações clonais de células DF1 expressando a SEQ ID NO:3 foi examinado, a taxa de recuperação variava de 0,8 a 20% com cinco clones avaliados com uma taxa de recuperação menor e seis clones avaliados com uma taxa de recuperação maior que a da linhagem de células não clonais em massa (Tabela 1). O vírus produzido pelo clone número 8 tinha uma taxa de recuperação de 10% que era 20 vezes maior que a do vírus produzido pelos ovos embrionados de galinha ou pelas células DF1 originais. O vírus produzido pelo clone número 40 tinha uma taxa de recuperação de 20% que era 40 vezes maior que a do vírus produzidos pelos ovos embrionados de galinha ou pelas células DF1 originais. Estes dados sugerem fortemente que a atividade do complemento apresentada no soro humano normal destruía as partículas de NDV que foram produzidas pelos ovos embrionados de galinha ou pelas células de fibroblasto embrionário de frango DF1 originais. Entretanto, as novas partículas de NDV produzidas pelas células DF-1 que não expressavam de forma estável o inibidor do complemento recombinante sobre a superfície celular exibiram uma taxa de recuperação notável até 40 mais alta quando comparados com o vírus produzido pelos ovos de galinha ou pelas células DF1 originais após a incubação com 40% de soro humano normal sob condições experimentais idênticas.

Tabela 1. Taxa de recuperação viral medida pela proporção do vírus recuperado após a incubação com 40% de soro humano normal (NHS)

vs 40% soro humano inativado com calor (iNHS)

NDV Oncolítico Produzido partindo de	% da taxa de recuperação após a incubação com soro humano
Ovos embrionados de galinha	0,5
Células DF1 Originais	0,5
Células DF1 não clonais que expressam a SEQ ID NO:3	5,8
Clone #1 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	4,3
Clone #2 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	5,2
Clone #3 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	0,8
Clone #4 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	6,8
Clone #5 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	3,6
Clone #6 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	1,5
Clone #7 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	7,1
Clone #8 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	10,0
Clone #10 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	6,1
Clone #11 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	6,0
Clone #40 DF1 que expressa a SEQ ID NO:3	20,0

#### Exemplo 4:

[00030] A atividade oncolítica de espectro amplo do NDV que foi produzido partindo das células DF1 que expressam de forma estável a proteína de fusão inibidora do complemento sobre sua superfície celular (Clone número 8) foi avaliada utilizando CellTiter96® AQueous One Solution. Esta solução funciona de forma similar aos ensaios com MTT (isto é, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) nos quais células metabolicamente ativas são capazes de biorreduzir MTS tetrazólio (isto é, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) no reagente em formazan cromogênico solúvel. Sucintamente, três linhagens de células tumorais diferentes HT1080 (fibrossarcoma), PANC-1 (carcinoma epitelial pancreático) e OV-CAR3 (adenocarcinoma de ovário) foram crescidas em placas de 96 poços se-

paradas. No dia seguinte, diluições em série do vírus NDV foram adicionadas nos respectivos poços e a placa foi incubada durante 6 dias na incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. No Dia 6, a absorbância de todos os poços em cada placa foi medida em 490 nm utilizando um espectrofotômetro. A IC<sub>50</sub> foi calculada utilizando análise de regressão não linear logística de 4 parâmetros para cada linhagem de célula. Isto resultou em valores de IC<sub>50</sub> finais de 255, 120 e 47 ufp/poço para as linhagens de célula HT1080, OV-CAR-3 e PANC-1 respectivamente (Figura 4). Estes resultados indicam que as partículas de NDV produzidas pelas células DF-1 que expressavam de forma estável o inibidor do complemento recombinante sobre sua superfície celular mantinham a capacidade de lisar várias linhagens de células tumorais de uma maneira dependente da dose.

#### LISTAGEM DE REFERÊNCIAS

- Carroll, M. C., E. M. Alicot, P. J. Katzman, L. B. Klickstein, J. A. Smith, and D. T. Fearon. 1988. Organization of the genes encoding complement receptors type 1 and 2, decay-accelerating factor, and C4-binding protein in the RCA locus on human chromosome 1. *J. Exp. Med.* 167:1271.
- Rey-Campos, J., P. Rubinstein, and S. Rodriguez de Cordoba. 1988. A physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. *J. Exp. Med.* 167:664.
- Lublin, D. M., and J. P. Atkinson. 1989. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 7:35.
5. Nakano, Y., K. Sumida, N. Kikuta, N. H. Miura, T. Tobe, and M. Tomita. 1992. Complete determination of disulfide bonds localized within the short consensus repeat units of decay accelerating factor (CD55 antigen). *Biochim. Biophys. Acta* 1116:235.
- Censullo, P., and M.A. Davitz. 1994a. How GPI-anchored proteins turn-over: or where do they go after arrival at the plasma membrane. *Semin*

Immunol. 6:81.

Censullo, P., and M.A. Davitz. 1994b. The fate of GPI-anchored molecules. *Braz J. Med. Biol. Res.* 27:289

Morgan, B. P., and S. Meri. 1994. Membrane proteins that protect against complement lysis. *Springer Semin. Immunopathol.* 15:369.

Turner A.J. 1994. PIG-tailed membrane proteins. *Essays Biochem.* 28:113.

Kim D.D., and W.C. Song. 2006. Membrane complement regulatory proteins. *Clin. Immunol.* 118:127.

Pecora, A.L., Rizvi, N., Cohen, G.I., Meropol, N.J., Sterman, D., Marshall, J.L., Goldberg, S., Gross, P., O'Neil, J.D., Groene, W.S., Roberts, M.S., Rabin, H., Bamat, M.K., and R.M. Lorence. 2002. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J. Clin. Oncol.* 20:2251.

Laurie, S.A., Bell, J.C., Atkins, H.L., Roach, J., Bamat, M.K., O'Neil, J.D., Roberts, M.S., Groene, W.S., and R.M. Lorence. 2006. A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. *Clin. Cancer Res.* 12:2555.

Lorence, R.M., Roberts, M.S., O'Neil, J.D., Groene, W.S., Miller, J.A., Mueller, S.N., and M.K. Bamat. 2007. Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. 7:157.

Biswas, M., Johnson, J.B., Kumar, S.R.P. Parks, G.D., and E. Subbiah. 2012. Incorporation of host complement regulatory proteins into Newcastle disease virus enhances complement evasion. *J. Virol.* 86:12708.

Rangaswamy, U.S., Cotter, C.R., Chang, X., Jin, H., and Z. Chen. 2016. CD55 is a key complement regulatory protein that counteracts complement-mediated inactivation of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 97:1765.



## REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende: (a) uma sequência peptídica de CD55, (b) uma sequência de ligação C-terminal à sequência de CD55, (c) um domínio transmembrana C-terminal à sequência de ligação e (d) um domínio intracelular C-terminal ao domínio transmembrana; em que a proteína de fusão não contém um ancorador de GPI.

2. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a sequência peptídica de CD55 é uma sequência peptídica de CD55 humana.

3. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que sequência (a) compreende quatro repetições consenso curtas (SCR) de CD55.

4. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o ligante é um ligante (G4S1)<sub>3</sub>.

5. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que domínio transmembrana é um domínio transmembrana de CD8.

6. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o domínio intracelular é um domínio intracelular de CD8 truncado.

7. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a sequência peptídica (a) está ligada de forma covalente à sequência peptídica (b) através de uma única ligação peptídica.

8. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a sequência peptídica (a) está ligada de forma covalente à sequência peptídica (b) por um espaçador.

9. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a sequência peptídica (b) está ligada de forma covalente à sequência peptídica (c) através de uma única ligação peptídica.

10. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a sequência peptídica (b) está ligada de forma covalente à sequência peptídica (c) por um espaçador.

11. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a sequência peptídica (c) está ligada de forma covalente à sequência peptídica (d) através de uma única ligação peptídica.

12. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a sequência peptídica (c) está ligada de forma covalente à sequência peptídica (d) por um espaçador.

13. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão compreende ainda um peptídeo sinal de secreção N-terminal à sequência (a).

14. Proteína de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o peptídeo sinal de secreção é um peptídeo sinal de secreção de CD55.

15. Proteína de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o peptídeo sinal N-terminal de secreção está covalentemente ligado à sequência (a) por um único peptídeo.

16. Proteína de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o peptídeo sinal N-terminal de secreção está covalentemente ligado à sequência (a) por um espaçador.

17. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que possui a sequência SEQ ID NO:2.

18. Proteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que possui a sequência SEQ ID NO:3.

19. Ácido nucleico caracterizado pelo fato de que codifica a proteína como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 18.

20. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico é DNA.

21. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que compreende um ou mais íntrons.

22. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que codifica uma proteína que possui a sequência SEQ ID NO:2.

23. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que possui a sequência SEQ ID NO:1.

24. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 19 a 23, ligado de forma operacional a uma sequência de controle.

25. Linhagem de células, caracterizada pelo fato de que expressa de forma estável a proteína como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 18 sobre a superfície celular.

26. Linhagem de células de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a linhagem de células é uma linhagem de células de mamífero.

27. Linhagem de células de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a linhagem de células é uma linhagem de célula de fibroblasto embrionário de frango DF-1.

28. Vírus envelopado caracterizado pelo fato de que incorpora a proteína como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 18 na membrana viral.

29. Vírus de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o vírus é um vírus oncolítico.

30. Vírus de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o vírus oncolítico é um Vírus da Doença de Newcastle.

31. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende o vírus como definido na reivindicação 29 ou 30 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

32. Processo para o tratamento de uma condição neoplásica em um indivíduo mamífero, caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade do vírus como definido na reivindicação 28, eficiente para tratar a condição..

33. Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o vírus é administrado de forma intratumoral.

34. Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o vírus é administrado de forma intravenosa.

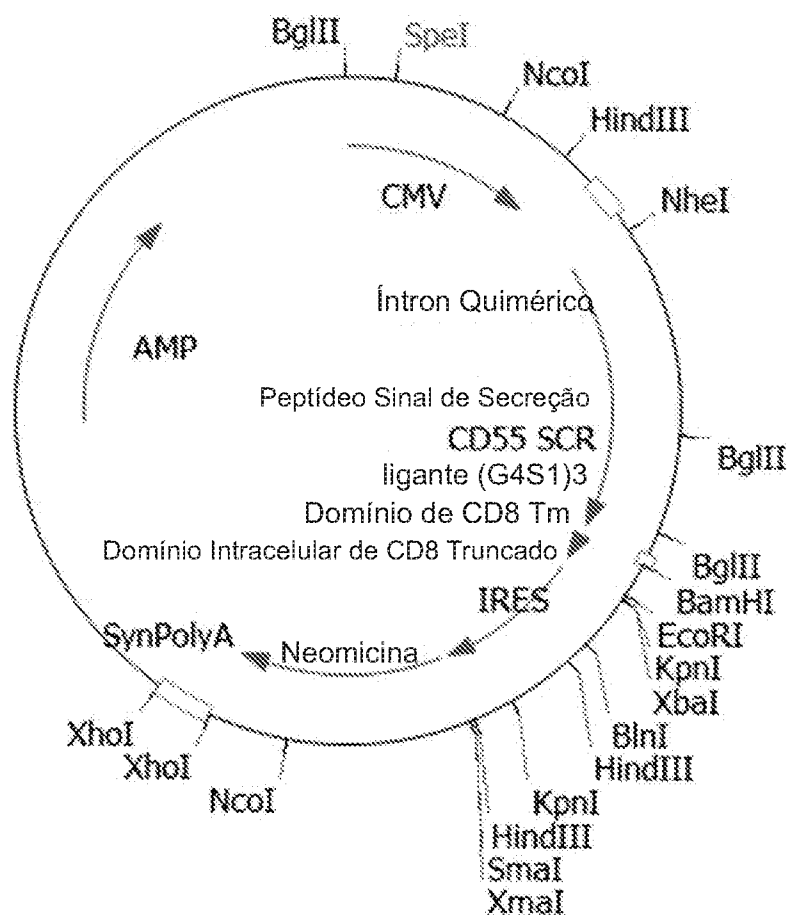


FIG. 1

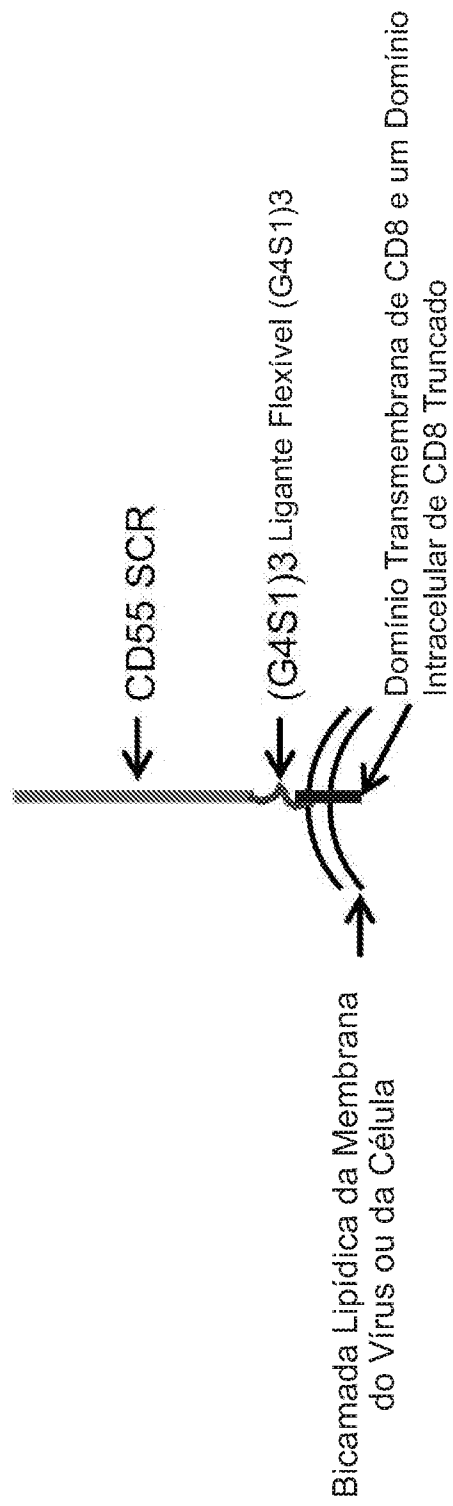


FIG. 2

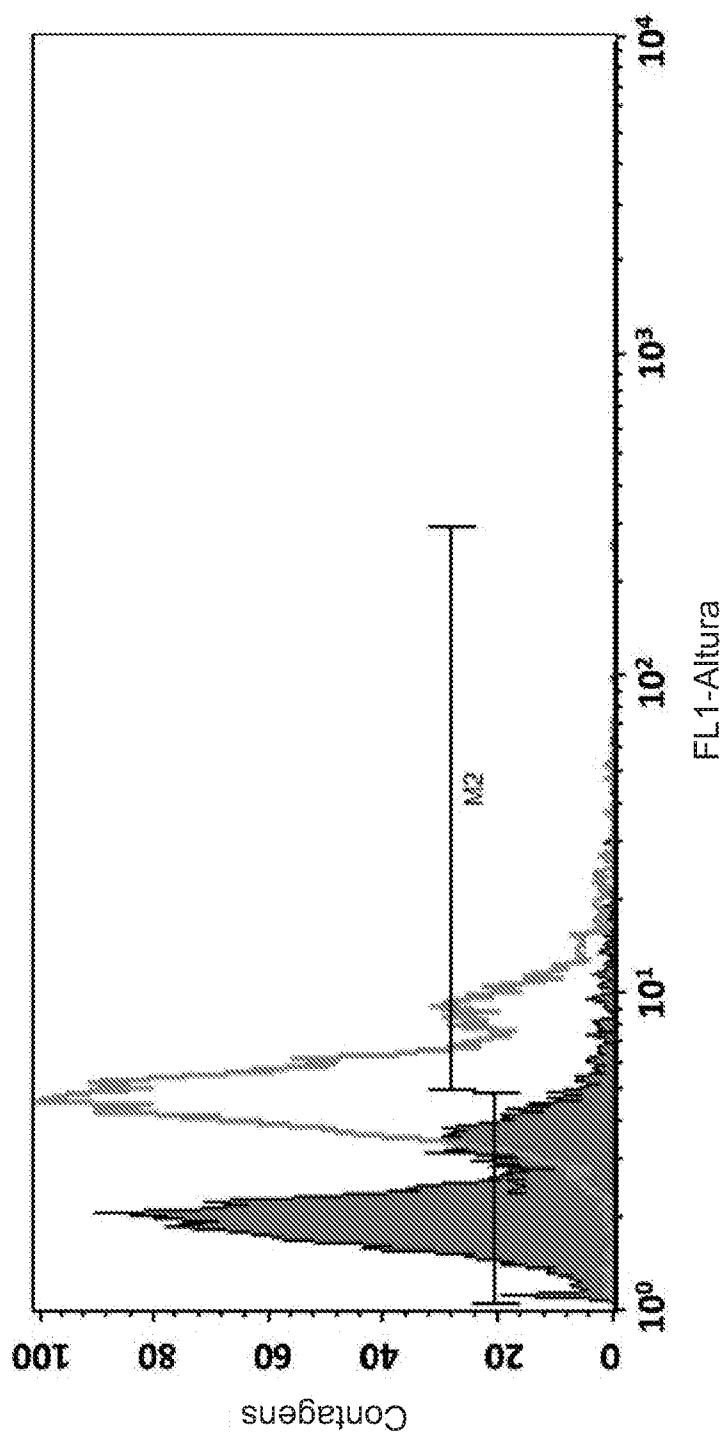


FIG. 3

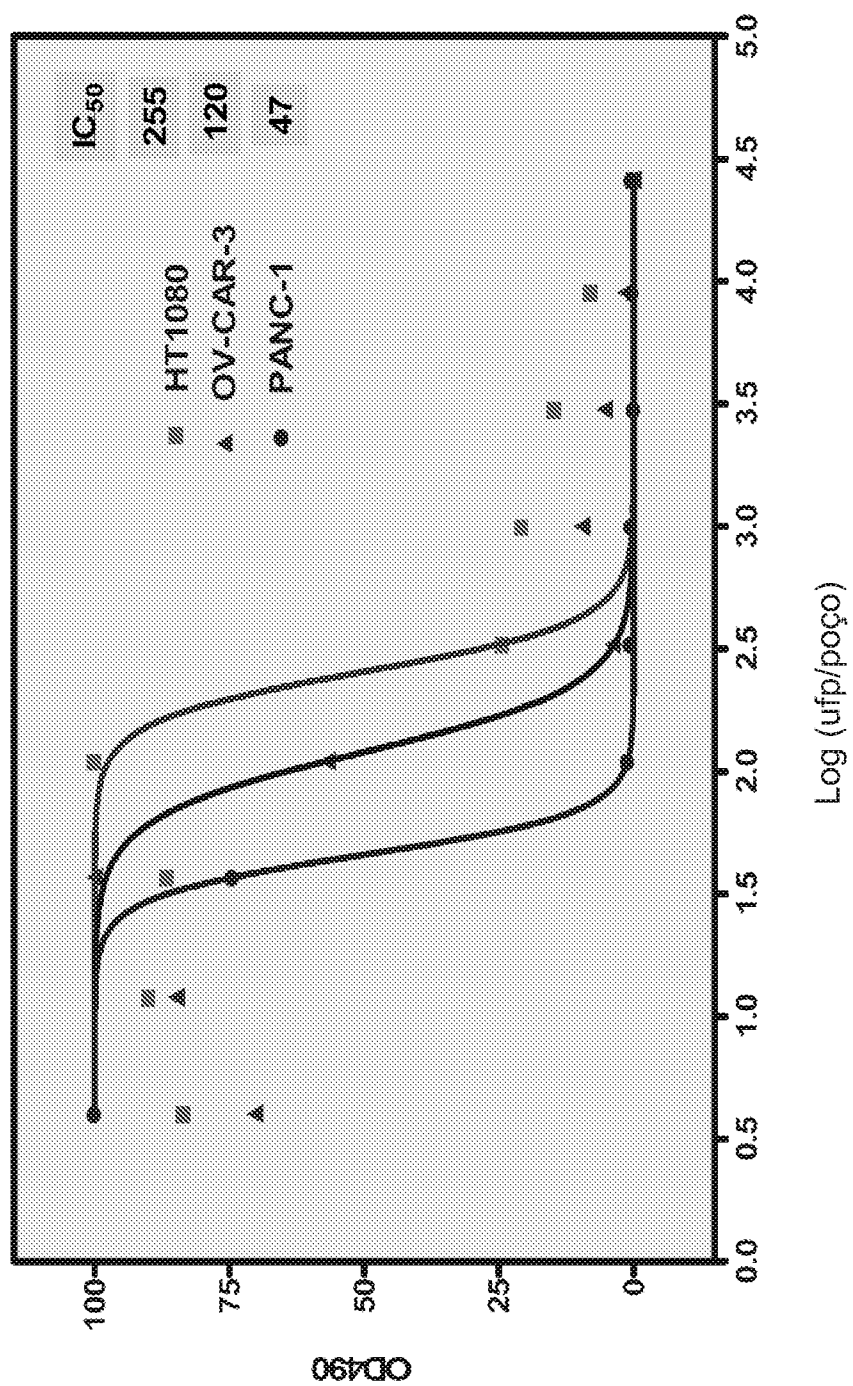


FIG. 4



MTVARPSVPAALPLLGELPRLLLLVLLCLPAVWGDCGLPPDVPNAQPALEGRTSFPEDTV  
ITYKCEESFVKIPGEKDSVICLKGSQWSDIEEF~~CNR~~SC~~EV~~PT~~RL~~NSASLKQPYITQNYFP  
VGTVVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLK~~W~~STAVEF~~C~~KK~~K~~SCPN~~GE~~IRNGQIDVPGGI  
LFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFC~~L~~ISGSSVQWSDPL~~PE~~CREIYCPAPPQIDNGIIQGER  
DHYGYRQSVTYACNKGF~~TM~~IGEH~~SI~~YCTVNNDEGEWSGPP~~PE~~CRGKSLTSKVPP~~TV~~QKPT  
TVNVPTTEVSP~~TS~~QKTTTKTTTPNAQA~~TR~~STPVSR~~TT~~KH~~F~~HETTPNKGSG~~TT~~GGGSGGG  
GSGGGSIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRRV (SEQ ID NO: 2)

FIG. 5

## RESUMO

Patente de Invenção: "VÍRUS ENVELOPADO RESISTENTE À INATIVAÇÃO PELO COMPLEMENTO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER".

É descrita uma proteína de fusão recombinante. A proteína de fusão compreende: (a) uma sequência peptídica de CD55, (b) uma sequência de ligação C-terminal à sequência de CD55, (c) um domínio transmembrana C-terminal à sequência de ligação, e (d) um domínio intracelular C-terminal ao domínio transmembrana. A proteína de fusão não contém um ancorador de GPI. A proteína de fusão pode ser expressada com um peptídeo sinal de secreção N-terminal, que é clivado para produzir a proteína madura sobre a superfície de uma linhagem de células ou um vírus envelopado. Um vírus oncolítico que expressa a proteína de fusão é resistente à inativação pelo complemento e pode ser utilizado para tratar câncer.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequencia.txt
- Data de Geração do Código: 06/12/2018
- Hora de Geração do Código: 15:21:39
- Código de Controle:
  - Campo 1: 8C408A8813F0E0C5
  - Campo 2: CA8FC0A9FF1FC2EF