



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

(11) PI 0906404-4 B1



(22) Data do Depósito: 26/01/2009

(45) Data de Concessão: 06/04/2021

(54) Título: CONSTRUÇÃO DE FUSÃO COM DOMÍNIO LÍTICO, SEUS USOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, BEM COMO PROCESSO PARA REDUZIR OU INIBIR SELETIVAMENTE A PROLIFERAÇÃO DE UMA CÉLULA QUE EXPRESSA UM RECEPTOR, LIGANTE OU ANTÍGENO

(51) Int.Cl.: C07K 7/08; C07K 14/59; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 24/01/2008 US 61/023,377.

(73) Titular(es): BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE; ESPERANCE PHARMACEUTICALS.

(72) Inventor(es): CAROLA LEUSCHNER; HECTOR ALILA.

(86) Pedido PCT: PCT US2009031999 de 26/01/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/094634 de 30/07/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/07/2010

(57) Resumo: CONSTRUCTO DE FUSÃO COM DOMÍNIO LÍTICO, COMPOSIÇÕES, DOSAGEM UNITÁRIA E KIT COMPREENDENDO O MESMO, BEM COMO SEUS USOS E PEPTÍDEO. A presente invenção refere-se a constructos de fusão, a processos de utilização de constructos de fusão e a processos de tratamento de proliferação celular ou distúrbios hiperproliferativos indesejáveis ou aberrantes, tais como tumores, cânceres, neoplasia e malignidades.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**CONSTRUÇÃO DE FUSÃO COM DOMÍNIO LÍTICO, SEUS USOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, BEM COMO PROCESSO PARA REDUZIR OU INIBIR SELETIVAMENTE A PROLIFERAÇÃO DE UMA CÉLULA QUE EXPRESSA UM RECEPTOR, LIGANTE OU ANTÍGENO**".

Pedidos de Patentes Relacionados

[0001] Este pedido de patente reivindica prioridade ao pedido de patente nº de série 61/023.377, depositado em 24 de janeiro de 2008, que é expressamente incorporado como referência aqui em sua totalidade.

Campo Técnico

[0002] A presente invenção refere-se a constructos de fusão, métodos de utilização de constructos de fusão e métodos de tratamento de proliferação celular indesejável ou aberrante ou distúrbios hiperproliferativos, tais como neoplasias, cânceres, tumores e malignidades não metastáticos ou metastáticos.

Introdução

[0003] A necessidade de desenvolver novos agentes terapêuticos para o tratamento de tumores primários e metástases é claramente evidente quando é considerada a taxa de sobrevivência de cinco anos de pacientes com câncer: apenas 10-40% para pacientes com câncer de pulmão, colorretal, de mama e de próstata sobrevivem se diagnosticados com doença metastática distante.

Sumário

[0004] A invenção se baseia, pelo menos em parte em domínios líticos fundidos ou conjugados a uma porção de ligação, referido aqui como constructos de fusão. Acredita-se que o contato de uma célula com um domínio lítico causa o rompimento da membrana celular que resulta na morte celular. A porção de ligação direciona as células para

destruição através do domínio lítico, incluindo células proliferantes indesejáveis ou aberrantes ou células hiperproliferantes, tais como neoplasias, cânceres, tumores e malignidades não metastáticos ou metastáticos. Um número de células neoplásicas, cancerosas, tumores e malignidades não metastáticos e metastáticos superexpressa receptores ou ligantes. Por exemplo, muitas neoplasias, cânceres, tumores e malignidades não metastáticos ou metastáticos, expressam receptores para hormônios (por exemplo, hormônio luteinizante/gonadotropina coriônica (LH/CG) ou hormônio de liberação de hormônio luteinizante (LHRH etc.), fatores de crescimento, citocinas, anticorpos etc., que podem ser utilizados como a porção de ligação do constructo de fusão.

[0005] Os constructos de fusão podem ser planejados para direcionar qualquer célula ou população de células que expressa o sítio de ligação para a porção de ligação. As porções de ligação tais como ligantes, anticorpos e fragmentos dos mesmos, fatores de crescimento, citocinas, etc., podem ser ligados a um domínio lítico para fornecer morte direcionada de células que expressam ou contêm receptores, antígenos, anticorpos, ligantes etc. reduzindo ou inibindo assim a proliferação ou o crescimento celular.

[0006] Os constructos de fusão não requerem que as células se dividam com a finalidade de matar as células-alvo. Além disso, não é provável que as constructos de fusão sejam imunogênicas porque podem ser produzidas possuindo tamanho relativamente pequeno. Em adição, os constructos de fusão matam células resistentes a vários fármacos.

[0007] Além disso, os constructos de fusão podem ter maior atividade citotóxica (IC_{50} baixa) em termos de atividade antiproliferativa de células ou atividade de matar e baixa atividade hemolítica (HA_{50}), de forma que a proporção de IC_{50} : HA_{50} (IC_{50}/HA_{50}) seja menor que a

de outros compostos com tais atividades. Por exemplo, os constructos de fusão podem possuir maior atividade antiproliferativa de células que Phor21- β CG-ala, Phor21-GSGGS- β CG-ala, Phor21-ASAAS- β CG-ala ou Phor 14- β CG-ala, que é determinada por um valor de IC₅₀ menor; possuir uma proporção de IC₅₀/HA₅₀ menor que Phor21- β CG-ala, Phor21-GSGGS- β CG-ala, Phor21-ASAAS- β CG-ala ou Phor 14- β CG-ala; ou possuir uma proporção de IC₅₀/HA₅₀ menor que aproximadamente 0,02, 0,01 ou 0,005.

[0008] De acordo com a invenção, são fornecidos constructos de fusão que incluem um primeiro e um segundo domínio. Em uma modalidade, um constructo de fusão inclui ou consiste em um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D de 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 resíduos que inclui uma sequência peptídica selecionada de, por exemplo, KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKK FAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK e um segundo domínio que inclui ou consiste em uma porção de direcionamento ou de ligação. Em outra modalidade, um constructo de fusão inclui ou consiste em um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKF AKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKK FAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK e um segundo domínio que inclui ou consiste em uma porção de direcionamento ou de ligação. Em uma modalidade adicional, um constructo de fusão inclui ou consiste em um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D selecionada de, KFAKFAKKFAKFA KK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKK FAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF,

KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAK KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK e um segundo domínio que consiste em uma sequência de 1-25 aminoácidos L ou D (por exemplo, porção de direcionamento ou de ligação) distinto do dito primeiro domínio.

[0009] De acordo com a invenção, são também fornecidos peptídeos isolados e purificados que incluem ou consistem em um primeiro domínio. Em várias modalidades, um peptídeo isolado ou purificado é KFAKFAKKF AKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAK FAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF ou KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA. Em modalidades adicionais, um peptídeo isolado ou purificado é KFAKFAKKFA KFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF ou KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA que possui um ou mais dos resíduos K substituídos por qualquer um de um resíduo F ou L, um ou mais dos resíduos F substituídos por qualquer um de um resíduo K, A ou L ou um ou mais dos resíduos A substituídos por qualquer um de um resíduo K, F ou L.

[00010] Os constructos de fusão incluem uma porção de ligação que se liga a um receptor, um ligante ou um antígeno. Uma porção de ligação inclui ainda um ligante, um antígeno ou um anticorpo. Os ligantes incluem ou consistem de uma molécula que se liga a um receptor, tal como um agonista ou um antagonista de receptor. Uma porção de ligação pode incluir ou consistir de uma estrutura linear ou cíclica.

[00011] Os exemplos não limitantes específicos de porções de ligação incluem um ou mais aminoácidos (por exemplo, peptídeos, polipeptídeos, proteínas), ácidos nucleicos e carboidratos. As classes não limitantes específicas de porções de ligação incluem hormônios, análogos de hormônios e fragmentos de hormônios e análogos de hormônios, fatores de crescimento, citocinas, anticorpos etc. que se ligam a um receptor. Os

exemplos não limitantes específicos de hormônios incluem um hormônio de liberação de gonadotropina ou seus análogos, cadeia beta do hormônio luteinizante, hormônio luteinizante, gonadotropina coriônica, subunidade beta da gonadotropina coriônica, hormônio estimulador de melanócitos, estradiol, dietilstilbesterol, lactoferrina, dopamina, somatostatina ou seus análogos, hormônio estimulador de folículos (FSH), glicocorticoide, estrogênio, testosterona, androstenodiona, di-hidrotestosterona, de-hidroepiandrosterona, androgênios, progesterona, hormônio estimulador da tiroide (TSH), insulina, catecolaminas, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), angiotensina, hormônio antidiurético, calcitonina, colecistocinina, bombesina, hormônio de liberação de corticotrofina, gastrina, grelina, glucagon, Hormônio de Liberação de Hormônio de Crescimento e seus análogos, inibina, orexina, peptídeo KiSS (GPR54), kisspeptina, Prolactina, Hormônio de Liberação de Prolactina, Hormônio de Crescimento, Her2/neu, folato, vitamina H, ferritina, Hormônio Paratiroide, Relaxina, Secretina, Hormônio de Liberação da Tirotropina, Endotelina, Renina, Lipotropina, melatonina etc.. Os exemplos não limitantes específicos de fatores de crescimento são fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento 1 e 2 similares à insulina (IGF-1, IGF-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Fator de Crescimento de Nervos (NGF), Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), Fator de Crescimento Transformador alfa e beta (TGF α , TGF β , Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF), ceruloplasmina etc. As classes não limitantes específicas de citocinas ou ligantes são interleucinas (por exemplo, interleucina 2, interleucina 17, CD154, Ligante Fas etc), Fatores de Necrose de Tumor (TNFs), interferons, etc.

[00012] As porções de ligação podem ser opcionalmente expressas em uma célula. As células que expressam uma porção de ligação (por exemplo, receptor, ligante, antígeno, anticorpo) ou que

podem ser direcionadas de acordo com os métodos da invenção incluem células hiperproliferativas. As células que expressam um receptor, um ligante ou um antígeno ou que podem ser direcionadas de acordo com os métodos da invenção incluem ainda células de mama, ovário, útero, cervicais, próstata, testículo, pancreáticas, de pele, células sanguíneas, adrenais, pituitária e endometriais. As classes não limitantes específicas de porções de ligação expressas em uma célula são receptores para hormônios, citocinas, fatores de crescimento (por exemplo, receptores de EGF, Her2/neu, ROR1), ferritina, receptores de transferrina, moléculas de adesão celular etc. Os exemplos não limitantes específicos de antígenos expressos em células proliferantes que podem ser direcionadas com anticorpos ou seus fragmentos são CD19, CD20, CD23, CD27, CD28, CD30, CD33, CD40, CD52, CD56, CD70, CD154, receptores similares à imunoglobulina etc. Os antígenos adicionais incluem, por exemplo, antígeno específico da próstata (PSA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), antígeno carcinoembrionário (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno específico da próstata (PSA), antígeno de câncer 125 (CA - 125) e outras moléculas receptoras que se ligam a ligantes descritos aqui.

[00013] O primeiro e o segundo domínios podem incluir ou consistir um aminoácido ou uma sequência de aminoácidos. Em aspectos particulares, um primeiro ou um segundo domínio possui aproximadamente 1 até 10, 10 até 20, 15 até 20 (isto é, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos), 20 até 30, 30 até 40, 40 até 50, 60 até 70, 70 até 80, 80 até 90, 90 até 100 ou mais resíduos de aminoácidos.

[00014] Em um aspecto particular, um primeiro domínio inclui ou consiste em uma estrutura de alfa-hélice anfipática. Em aspectos particulares adicionais, um segundo domínio inclui ou consiste em uma sequência de aminoácidos apresentada como SYAVALSAQAALARR

ou QHWSYGLRPG.

[00015] O primeiro e o segundo domínios podem ser posicionados no terminal NH ou no terminal C em relação um ao outro. Assim, em uma modalidade o primeiro domínio (peptídeo lítico) fica posicionado no terminal NH em relação ao segundo domínio (porção de ligação ou ligante) e em outra modalidade, o segundo domínio (porção de ligação ou ligante) fica posicionado no terminal C em relação ao primeiro domínio (peptídeo lítico).

[00016] O primeiro e o segundo domínios podem incluir ou consistir um ou mais D-aminoácidos. Em aspectos particulares, um primeiro domínio possui um D-aminoácido, por exemplo, em qualquer um de um resíduo K, F ou A.

[00017] O primeiro e o segundo domínios podem ser ligados através de uma ligação covalente. Por exemplo, um primeiro e um segundo domínio podem ser ligados por um ligante peptídico ou não peptídico. Em aspectos particulares, o primeiro e o segundo domínios são ligados através de uma sequência peptídica que possui de aproximadamente 1 até 25 resíduos de aminoácidos ou que possui uma cadeia de carbono linear. Em aspectos mais particulares, o primeiro e o segundo domínios são ligados através de uma sequência peptídica que inclui ou consiste em um ou mais resíduos de aminoácidos A, S ou G. Em aspectos particulares adicionais, o primeiro e o segundo domínios são ligados através de uma sequência peptídica um primeiro e um segundo domínios são ligados através de uma sequência peptídica que inclui ou consiste em GSGGS, ASAAS ou CCCCCC.

[00018] O primeiro e o segundo domínios podem incluir ou consistir ainda em domínios adicionais. Assim, em vários aspectos, um constructo de fusão inclui um terceiro, um quarto, um quinto, um sexto, um sétimo domínio etc.

[00019] Os constructos de fusão incluem ou consistem em formas isoladas e purificadas. Os constructos de fusão incluem ou consistem ainda em uma mistura. Tais misturas incluem composições, tais como uma mistura de constructo de fusão e o veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável apropriado para administração a ou contato in vivo com um indivíduo ou uma mistura de constructo de fusão e um agente antiproliferativo de célula ou estimulador do sistema imunológico.

[00020] Os constructos de fusão incluem ou consistem em uma forma de dosagem unitária. Em uma modalidade, um constructo de fusão é uma dosagem unitária em uma quantidade eficiente para tratar um indivíduo que possui proliferação de células indesejáveis ou um distúrbio hiperproliferativo. Em outra modalidade, um constructo de fusão é uma dosagem unitária em uma quantidade eficiente para tratar um indivíduo que possui uma neoplasia, um tumor ou um câncer. Em uma modalidade adicional, um constructo de fusão é uma dosagem unitária em uma quantidade eficiente para reduzir a fertilidade de um indivíduo.

[00021] Os constructos de fusão podem ser incluídas dentro de kits, opcionalmente com instruções para a prática de um método. Em uma modalidade, um kit inclui um constructo de fusão e instruções para reduzir ou inibir a proliferação de uma célula, reduzir ou inibir a proliferação de uma célula hiperproliferativa, reduzir ou inibir a proliferação de uma célula neoplásica, tumoral ou cancerosa, tratar um indivíduo que possui um distúrbio hiperproliferativo, tratar um indivíduo que possui uma neoplasia, um tumor ou um câncer ou reduzir a fertilidade de um animal.

[00022] De acordo com a invenção, são também fornecidos ácidos nucleicos que codificam constructos de fusão. Em uma modalidade, um ácido nucleico codifica um constructo de fusão que inclui ou

consiste em um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D de 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 resíduos que inclui uma sequência peptídica selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKK FAKFAKKF, KFAKFAK KFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAK KFAKFAKK FAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAK FAKKFAKFAK e um segundo domínio que inclui ou consiste em uma porção de direcionamento ou de ligação. Em outra modalidade, um ácido nucleico codifica um constructo de fusão que inclui ou consiste em um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAK FAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK, KFAKFAKKFAKFA KFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK e um segundo domínio que inclui ou consiste em uma porção de direcionamento ou de ligação. Em uma modalidade adicional, um ácido nucleico codifica um constructo de fusão que inclui um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAK AKKF, KFAKFAKKFAK FAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAK FAKKFAKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK KFAKFAK e um segundo domínio que inclui ou consiste em uma sequência de 1-25 aminoácidos L ou D (por exemplo, porção de direcionamento ou de ligação) distinto do dito primeiro domínio.

[00023] Os ácidos nucleicos podem ser incluídos em um vetor, tal como um vetor de expressão que quando expresso em uma célula codifica um constructo de fusão. As células hospedeiras podem ser transformadas com um ácido nucleico em um vetor, de forma que a célula expressa um constructo de fusão codificada pelo ácido nucleico.

[00024] Os constructos de fusão são úteis para, entre outras coisas,

reduzir ou inibir a proliferação de uma célula, reduzir ou inibir a proliferação celular, reduzir ou inibir a proliferação de uma célula hiperproliferativa, reduzir ou inibir a proliferação de uma célula neoplásica, tumoral, cancerosa ou maligna e tratar a proliferação celular indesejável ou aberrante, tal como células hiperproliferantes ou distúrbios hiperproliferativos. Os exemplos não limitantes de distúrbios hiperproliferativos incluem hiperplasia benigna, neoplasias não metastáticas e metastáticas, cânceres, tumores e malignidades (por exemplo, um tumor sólido ou líquido, mieloma, linfoma, leucemia, carcinoma, sarcoma, melanoma, neural, reticuloendotelial e hematopoiético).

[00025] De acordo com a invenção, são adicionalmente fornecidos métodos de redução ou de inibição da proliferação de uma célula; métodos de redução ou de inibição da proliferação celular; métodos de redução ou de inibição da proliferação de uma célula hiperproliferativa; e métodos de redução ou de inibição da proliferação de uma célula neoplásica, tumoral, cancerosa ou maligna. Em várias modalidades, um método inclui o contato de uma célula com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula; o contato de uma célula com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação celular; o contato de uma célula com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula hiperproliferativa; e o contato de uma célula com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula neoplásica, tumoral, cancerosa ou maligna.

[00026] De acordo com a invenção, são, além disso, fornecidos métodos de redução ou inibição seletiva da proliferação de uma célula que expressa um receptor ou um antígeno; de redução ou inibição seletiva da proliferação de uma célula hiperproliferativa que expressa

um receptor ou um antígeno; e de redução ou inibição seletiva da proliferação de uma célula neoplásica, tumoral, cancerosa ou maligna que expressa um receptor ou um antígeno. Em várias modalidades, um método inclui o contato de uma célula com o constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula, em que a porção de ligação do dito peptídeo se liga ao receptor, ao ligante ou ao antígeno expresso pela célula; o contato de uma célula com o constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula hiperproliferativa, em que a porção de ligação do dito peptídeo se liga ao receptor, ao ligante ou ao antígeno expresso pela célula hiperproliferativa; e o contato de uma célula com o constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula neoplásica, tumoral, cancerosa ou maligna, em que a porção de ligação do dito constructo de fusão se liga ao receptor, ao ligante ou ao antígeno expresso pela célula.

[00027] As células direcionadas de acordo com os métodos da invenção incluem células que expressam um receptor ou um antígeno, tal como um receptor de hormônio, por exemplo, um hormônio sexual ou esteroide gonadal ou um receptor de hormônio sexual ou esteroide gonadal. As células direcionadas de acordo com os métodos da invenção incluem ainda células que expressam um receptor que se liga a um hormônio de liberação de gonadotropina I, hormônio de liberação de gonadotropina II, hormônio de liberação de hormônio luteinizante III de lampreia, cadeia beta do hormônio luteinizante, hormônio luteinizante, gonadotropina coriônica, subunidade beta da gonadotropina coriônica, hormônio estimulador de melanócitos, estradiol, dietilstilbesterol, dopamina, somatostatina, hormônio estimulador de folículos (FSH), glicocorticoide, estrogênio, testosterona, androstenodiona, di-hidrotestosterona, de-hidroepiandrosterona, progesterona, androgênio, prolactina, Hormônio

de Liberação de Prolactina, hormônio antidiurético, angiotensinas, catecolaminas, fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento similares à insulina 1 e 2 (IGF-1, IGF-2), Hormônio de Crescimento (GH), Her2/neu, vitamina H, folato, transferrina, hormônio estimulador da tireoide (TSH), Hormônio Paratiroide (PTH), endotelina, bombesina, Renina, Lipotropina, hormônio de melatonina, relaxina, Secretina, Hormônio de Crescimento, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), peptídeo intestinal vasoativo, lactoferrina, uma integrina (por exemplo, integrina alfa-5 beta 3 ou alfa-5 beta 1), Fator de Crescimento de Nervos, Fator de Crescimento Transformador alfa e beta (TGF- α e β), Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF), Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), CD-33, CD19, CD20, CD40, ROR1, IGF-1, antígeno carcinoembrionário (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno específico da próstata (PSA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), antígeno de câncer 125 (CA - 125), interleucina 17, CD154, receptor de Interleucina-2 (IL-2) solúvel, tirosinase, MAGE-1, MAGE-2, NY-ESO-1, Melan-A/MART-1, glicoproteína (gp) 75, gp100, beta-catenina, PRAME, MUM-1, ZFP161, Ubiquitina-1, HOX-B6, YB-1, Osteonectina, ILF3, ácido fólico ou um derivado do mesmo, um membro da família de fatores de necrose de tumor (TNF), TNF-alfa, TNF-beta (linfotóxina, LT), TRAIL, Fas, LIGHT, 41BB, Fator de Crescimento Transformador alfa, Fator de Crescimento Transformador beta, insulina, ceruloplasmina, HIV-tat, um peptídeo ou uma proteína que compreende um motivo de sequência RGD, um monossacarídeo, um dissacarídeo, um oligossacarídeo, ácido siálico, galactose, manose, fucose ou ácido acetilneuramínico.

[00028] Os métodos realizados incluem, entre outros, o contato de um indivíduo que necessita de inibição, redução ou prevenção da proliferação, sobrevivência, diferenciação, morte ou atividade de células, tais como uma célula hiperproliferativa ou uma célula proliferativa de

forma indesejável. Os exemplos de indivíduos incluem um indivíduo que tem ou está em risco de ter proliferação celular indesejável ou aberrante; um indivíduo que tem ou está em risco de ter uma hiperplasia benigna; ou uma neoplasia, um câncer, um tumor ou uma malignidade não metastática ou metastática (por exemplo, um tumor sólido ou líquido, mieloma, linfoma, leucemia, carcinoma, sarcoma, melanoma, neoplasia neural, reticuloendotelial e hematopoiética).

[00029] De acordo com a invenção, são adicionalmente fornecidos métodos de tratamento de um indivíduo que tem um distúrbio hiperproliferativo e métodos de tratamento de um indivíduo que tem uma neoplasia, um tumor, um câncer ou uma malignidade (metastática, não metastática ou benigna). Em várias modalidades, um método inclui a administração a um indivíduo de uma quantidade do constructo de fusão suficiente para tratar o distúrbio hiperproliferativo; e a administração a um indivíduo de uma quantidade do constructo de fusão suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da neoplasia, do tumor, do câncer ou da malignidade.

[00030] Os métodos incluem o tratamento de um indivíduo que tem ou está em risco de ter uma metástase. Por exemplo, uma quantidade de um constructo de fusão eficiente para reduzir ou inibir o espalhamento ou a disseminação de um tumor, um câncer ou uma neoplasia para outros locais, localizações ou regiões dentro do indivíduo. Em várias modalidades, um método reduz ou inibe a metástase de um tumor ou um câncer primário em um ou mais outros locais, a formação ou o estabelecimento de uma metástase em um ou mais outros locais, localizações ou regiões reduzindo ou inibindo assim a reincidência do tumor ou do câncer ou a progressão do tumor ou do câncer. Em modalidades adicionais, um método reduz ou inibe o crescimento, a proliferação, a mobilidade ou a capacidade de invasão de células tumorais ou cancerosas que potencialmente ou desenvolvem metástases

(por exemplo, células tumorais disseminadas); reduz ou inibe a formação ou o estabelecimento de metástases que se originam partindo de um tumor ou um câncer primário em um ou mais outros locais, localizações ou regiões distintas daquelas do tumor ou câncer primário; reduz ou inibe o crescimento ou a proliferação de uma metástase em um ou mais outros locais, localizações ou regiões distintas daquelas do tumor ou câncer primário após a metástase ter sido formada ou ter sido estabelecida; ou reduz ou inibe a formação ou o estabelecimento de metástases adicionais após a metástase ter sido formada ou estabelecida. Ainda em outra modalidade, um método reduz ou inibe a reincidência ou a progressão da neoplasia, do tumor, do câncer ou da malignidade.

[00031] De acordo com a invenção, são também adicionalmente fornecidos métodos de redução ou de inibição da metástase de uma neoplasia, um tumor, um câncer ou uma malignidade para outros locais ou da formação ou do estabelecimento de neoplasia, tumor, câncer ou malignidade metastática em outros locais distais de uma neoplasia, um tumor, um câncer ou uma malignidade primária. Em várias modalidades, um método inclui a administração a um indivíduo de uma quantidade do constructo de fusão suficiente para reduzir ou inibir a metástase da neoplasia, do tumor, do câncer ou da malignidade para outros locais ou a formação ou o estabelecimento de neoplasia, tumor, câncer ou malignidade metastática em outros locais distais da neoplasia, do tumor, do câncer ou da malignidade primária.

[00032] A neoplasia, o tumor, o câncer e a malignidade que podem ser tratados de acordo com a invenção incluem massa celular sólida, células hematopoiéticas ou um carcinoma, sarcoma (por exemplo, linfossarcoma, lipossarcoma, osteossarcoma, condrossarcoma, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma ou fibrossarcoma), linfoma, leucemia, adenoma, adenocarcinoma, melanoma, glioma, glioblastoma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma,

astrocitoma, oligodendrocitoma, mesotelioma, neoplasia, tumor, câncer ou malignidade reticuloendotelial, linfática ou hematopoiética (por exemplo, mieloma, linfoma ou leucemia).

[00033] A neoplasia, o tumor, o câncer e a malignidade que podem ser tratados de acordo com a invenção podem estar presentes em ou afetar um pulmão (câncer pulmonar de células pequenas ou pulmonar de células que não são pequenas), neoplasia, tumor, câncer ou malignidade de tireoide, cabeça ou pescoço, nasofaringe, garganta, nariz ou seios da face, cérebro, espinha dorsal, mama, glândula adrenal, glândula pituitária, tireoide, linfa, gastrointestinal (boca, esôfago, estômago, duodeno, íleo, jejuno (intestino delgado), cólon, reto), trato genitourinário (útero, ovário, cérvix, endometrial, bexiga, testículo, pênis, próstata), rim, pâncreas, fígado, osso, medula óssea, linfa, sangue, músculo, pele ou célula tronco.

[00034] Os métodos podem ser praticados com outros tratamentos ou terapias (por exemplo, ressecção cirúrgica, radioterapia, terapia com radiação ionizante ou química, quimioterapia, imunoterapia, terapia ou vacinação térmica local ou regional (hipertermia)). Tais tratamentos ou terapias podem ser administradas antes de, substancialmente de forma contemporânea a (separadamente ou em uma mistura) ou após a administração de um constructo de fusão. Em uma modalidade, um método inclui a administração de um tratamento ou uma terapia antiproliferativa de célula, antineoplásica, antitumor, anticâncer ou intensificadora do sistema imunológico. Em modalidades adicionais, um método inclui a administração de um agente alquilante, antimetabólito, extrato vegetal, alcaloide de planta, nitrosourea, hormônio, análogo de nucleosídeo ou de nucleotídeo; ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina A, prednisolona, melfalan, clorambucil, mecloretamina, busulfan, metotrexato, 6-mercaptopurina, tioguanina, 5-fluorouracil, citosina arabinosídeo, 5-azacitidina (5-AZC) e

compostos relacionados a 5-azacitidina, bleomicina, actinomicina D, mitramicina, mitomicina C, carmustina, lomustina, semustina, estreptozotocina, hidroxiuréia, cisplatina, carboplatina, oxiplatina, mitotano, procarbazona, dacarbazina, taxol, vinblastina, vincristina, doxorubicina ou dibromomanitol, inibidores de topoisomerase, (irinotecan, topotecan, etoposídeo, teniposídeo), gencitabina, pemetrexed etc. As terapias celulares ou imunológicas incluem linfócitos, células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas, células T, células NK ou células B; um anticorpo, um fator de crescimento de célula, um fator de sobrevivência de célula, um fator de diferenciação de célula, uma citocina ou uma quimiocina (os exemplos são interleucinas IL-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), IFN- γ , IL-12, TNF- α , TNF β , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, SDF-1, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxina, eotaxina-2, I-309/TCA3, ATAC, HCC-1, HCC-2, HCC-3, LARC/MIP-3 α , PARC, TARC, CK β , CK β 6, CK β 7, CK β 8, CK β 9, CK β 11, CK β 12, C10, IL-8, GRO α , GRO β , ENA-78, GCP-2, PBP/CTAPIII β -TG/NAP-2, Mig, PBSF/SDF-1 ou linfotactina) etc.

[00035] Os agentes adicionais que podem ser aplicados com os constructos de fusão são fármacos ou agentes biológicos direcionados tais como anticorpos ou moléculas pequenas. Os exemplos não limitantes de anticorpos monoclonais incluem rituximab (Rituxan®), trastuzumab (Herceptin), bevacizumab (Avastin), cetuximab (Erbix), alemtuzumab (Campath), panitumumab (Vectibix), ibritumomab tiuxetan (Zevalin), tositumomab (Bexxar) etc. que podem ser utilizados em combinação com, *inter alia*, um constructo de fusão de acordo com a invenção. Outros fármacos direcionados que podem ser aplicados para uso com os constructos de fusão são imatinib (Gleevec), gefitinib (Iressa), bortezomib (Velcade), lapatinib (Tykerb), sunitinib (Sutent), sorafenib (Nexavar), nilotinib (Tasigna) etc.

[00036] Os métodos da invenção incluem o fornecimento a um indivíduo de um benefício. Em modalidades particulares, um método de tratamento resulta na destruição parcial ou completa da massa, do volume, do tamanho de células neoplásicas, tumorais, cancerosas ou malignas ou números de células, que estimulam, induzem ou aumentam a necrose, a lise ou a apoptose de células neoplásicas, tumorais, cancerosas ou malignas, reduzindo o volume e o tamanho da neoplasia, do tumor, do câncer ou da malignidade, a massa de células, inibindo ou prevenindo a progressão ou um aumento no volume, na massa, no tamanho da neoplasia, do tumor, do câncer ou da malignidade ou nos números de células ou prolongando o tempo de vida; resulta na redução ou na diminuição da gravidade, duração ou frequência de um sintoma adverso ou complicação associada com ou causada pela neoplasia, pelo tumor, pelo câncer ou pela malignidade; resulta na redução ou na diminuição de dor, desconforto, náusea, fraqueza ou letargia; ou resulta em maior energia, apetite, melhor mobilidade ou bem estar psicológico.

[00037] De acordo com a invenção, são ainda adicionalmente fornecidos métodos de redução da fertilidade de um animal; métodos de tratamento ou de redução da endometriose, hiperplasia benigna da próstata, um fibroide ou um pólip. Em várias modalidades, um método inclui a administração a um animal (por exemplo, mamífero, tal como um ser humano) de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para reduzir a fertilidade; a administração a um animal (por exemplo, mamífero, tal como um ser humano) de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para tratar ou reduzir endometriose; a administração a um animal (por exemplo, mamífero, tal como um ser humano) de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para tratar ou reduzir hiperplasia benigna da próstata; e a administração a um animal (por exemplo, mamífero, tal como um ser

humano) de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para tratar ou reduzir um fibroide ou um pólipio.

[00038] Os indivíduos que podem ser tratados de acordo com os métodos incluem mamíferos. Em modalidades particulares, um indivíduo é um ser humano.

Descrição das Figuras

[00039] A figura 1 mostra que LHRH-Phor21 mata células cancerosas mais rapidamente que Phor21- β CG-ala. As células de câncer de mama humano (MDA-MB-435S.luc, vários números de passagem) foram incubadas com Phor21- β CG-ala ou LHRH-Phor21.

[00040] A figura 2 mostra a citotoxicidade à célula MDA-MB-435S.luc (IC₅₀ micromolar) de constructos de fusão β CG-ala que possuem 21 (Phor21), 18 (Phor18 (338983) = CLIP71) e 15 (Phor15) aminoácidos em seu domínio lítico, comparada à Phor21- β CG-ala.

[00041] A figura 3 mostra a citotoxicidade às células MDA-MB-435S.luc (IC₅₀ micromolar) de constructos de fusão β CG-ala e LHRH. Os constructos de fusão mais tóxicos para as células MDA-MB-435S.luc que Phor21- β CG-ala são listadas à direita da figura.

[00042] A figura 4 mostra a citotoxicidade à célula MDA-MB-435S.luc (IC₅₀ micromolar) de constructos de fusão LHRH. Os constructos de fusão são: 323033 = Phor21- β CG-ala, 337479 = LHRH-Phor21, 337480 = Phor21-LHRH, 338611 = D-ala-Phor21-LHRH, 338612 = Phor18-ASAAS-LHRH, 338613 = Phor18-LHRH, 339385 = D-ala-Phor18-LHRH e 339347 = Phor18-Lupron.

[00043] A figura 5 mostra a atividade hemolítica aguda (HA₅₀ micromolar) de constructos de fusão β CG-ala e LHRH para as células sanguíneas vermelhas humanas comparadas com Phor21- β CG-ala. Todas os constructos de fusão tinham atividade hemolítica significativamente menor que Phor21- β CG-ala, exceto para LHRH-Phor21, Phor21-LHRH e Phor18-Lupron (QHWSY(D-Leu)LRPNEt =

Lupron).

[00044] A figura 6 mostra uma comparação de citotoxicidade e atividade hemolítica. Os peptídeos indicados com setas são mais tóxicos para as células que Phor21- β CG-ala.

[00045] A figura 7 é um planejamento de tratamento apresentado.

[00046] As figuras 8A-8J constituem um resumo de condições de tumor durante o tratamento e no ponto final do estudo com 3 conjugados β CG em comparação com Phor21 não conjugado, Phor18 não conjugado (338983)= (CLIP71) e um conjugado de (KKKFAFA)₃ (338984). Os códigos das constructos de fusão, 33 = Phor21 β -CG-ala; 76 = Phor18- β CG-ala; 81 = D-ala-Phor21- β CG-ala; 85 = D-ala-Phor18-LHRH; 47 = Phor18-Lupron; 13 = Phor18-LHRH; 11 = D-ala-Phor21-LHRH; 12 = Phor18-ASAAS-LHRH; 71 = Phor15- β CG-ala; e 74 = Phor15-C6- β CG-ala são seguidos pelas quantidades do constructo utilizadas no estudo.

[00047] As figuras 9A-9H mostram o volume de tumor dos grupos de tratamento comparado com os valores para solução salina e de linha de base para A) Phor21- β CG-ala (33); B) D-ala-Phor21-LHRH (11); C) Phor18-Lupron (47); D) Phor18-ASAAS-LHRH (12); E) Phor18-LHRH (13); F) (KKKFAFA)₃-LHRH; G) D-ala-Phor18-LHRH (85) nos períodos de tempo indicados até 30 dias; e H) comparado com a linha de base.

[00048] As figuras 10A-10E mostram um resumo de condições de tumor no ponto final do estudo com 5 conjugados de LHRH em comparação com Phor21- β CG-ala para A) Pesos dos tumores, B) Alteração do peso do tumor comparado com o da linha de base, C) Número total de células tumorais vivas, D) alterações do número total de células tumorais vivas comparadas com o da linha de base e E) pesos corporais. 338614 = (KKKFAFA)₃ LHRH, 338612 = Phor18-ASAAS-LHRH, 338613 = Phor18-LHRH e 339385 = D-ala-Phor18-

LHRH.

[00049] A figura 11 mostra células de câncer de ovário (OVCAR 3), que são resistentes a vários fármacos, incubadas com concentrações crescentes de Phor21- β CG-ala na presença de Doxorubicina nas quantidades indicadas e potencialização da morte celular por um fator de 200 na concentração mais alta de doxorubicina pela combinação.

[00050] A figura 12 mostra a citotoxicidade sobre células CHO (Ovário de Hamster Chinês) e TM4 em comparação às células MDA-MB-435S.luc com os constructos de fusão LHRH e Phor21 e β CG e Phor21. As células TM4 são negativas em relação ao receptor de LHRH, as células CHO são negativas em relação ao receptor de CG e as células MDA-MB-435S.luc expressam tanto os receptores de LHRH quanto de CG.

Descrição Detalhada

[00051] A invenção se baseia pelo menos em parte em um constructo de fusão que inclui uma porção lítica do primeiro domínio ligada ou fundida com uma porção de ligação do segundo domínio. Em uma configuração típica, o primeiro domínio de um constructo de fusão inclui uma porção lítica, que é diretamente ou indiretamente tóxica para uma célula, que pode assim reduzir a proliferação ou a sobrevivência celular ou estimular, induzir, aumentar ou intensificar a morte celular, a morte ou a apoptose; e o segundo domínio de um constructo de fusão inclui uma porção que se direciona a uma célula, referida como uma entidade da porção de ligação.

[00052] De acordo com a invenção, são fornecidos constructos de fusão que incluem ou consistem em um primeiro domínio "lítico" e incluem ou consistem em um segundo domínio "de direcionamento" ou "de ligação". Em uma modalidade, um constructo de fusão inclui um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D de 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28

resíduos que inclui uma sequência peptídica (selecionada de aminoácidos tais como Lisina=K, Fenilalanina = F e Alanina = A), por exemplo, KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAK KFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKF AKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAK KFAKFAKKFAKF AK e um segundo domínio que inclui ou consiste em uma porção de direcionamento ou de ligação. Em outra modalidade, um constructo de fusão inclui um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKF AKFAK KFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKF AKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK e um segundo domínio que inclui ou consiste em uma porção de direcionamento ou de ligação. Em uma modalidade adicional, um constructo de fusão inclui ou consiste em um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFA KKF, KFAKFAK ZKFAK FAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKF AKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKF AKFAK e um segundo domínio que consiste em uma sequência de 1-25 aminoácidos L ou D (por exemplo, porção de direcionamento ou de ligação) distinta do dito primeiro domínio.

[00053] Como utilizado aqui, o termo "fusão" ou "quimérica" e variações gramaticais do mesmo, quando utilizado em referência a um constructo, significa que o constructo contém porções ou seções que são derivadas de, obtidas ou isoladas de ou se baseiam na ou são modeladas após duas entidades moleculares diferentes que são distintas uma da outra e não existem tipicamente juntas na natureza. Ou seja, por exemplo, uma porção do constructo de fusão inclui ou consiste em uma porção lítica e uma segunda porção do constructo

inclui ou consiste em uma porção de direcionamento, tal como uma porção que possui capacidade de ligação, cada um do primeiro e do segundo domínios estruturalmente distintos. Um constructo de fusão também pode ser referida como um "conjugado", em que o conjugado inclui ou consiste em uma porção lítica do primeiro domínio e uma porção de direcionamento ou de ligação do segundo domínio.

[00054] Os primeiros domínios e ou os segundos domínios de constructos de fusão incluem ou consistem em sequências de aminoácidos (peptídeos, polipeptídeos, proteínas, lectinas), ácidos nucleicos (DNA, RNA) e carboidratos (sacarídeos, ácido siálico, galactose, manose, fucose, ácido acetilneuramínico etc.). Os termos "sequência de aminoácidos", "proteína", "polipeptídeo" e "peptídeo" são utilizados aqui de forma intercambiável para se referirem a dois ou mais aminoácidos ou "resíduos", ligados covalentemente por uma ligação amida ou equivalente. As sequências de aminoácidos podem ser ligadas por ligações químicas não naturais ou que não são de amida que incluem, por exemplo, aquelas formadas com glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, maleimidas bifuncionais ou N,N'-díciclo-hexilcarbodi-imida (DCC). As ligações que não são de amida incluem, por exemplo, cetometileno, aminometileno, olefina, éter, tioéter e similares (ver, por exemplo, Spatola em Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357 (1983), "Peptide and Backbone Modifications", Marcel Decker, NY).

[00055] O primeiro e o segundo domínios de um constructo de fusão ou quimera incluem sequências de L-aminoácidos, sequências de D-aminoácidos e sequências de aminoácidos com misturas de L-aminoácidos e D-aminoácidos. As sequências de aminoácidos do primeiro e do segundo domínios podem ser uma estrutura linear ou cíclica, conjugada a uma porção distinto (por exemplo, terceiro, quarto,

quinto, sexto, sétimo etc. domínios), formam ligações dissulfeto intra ou intermoleculares e formam ainda multímeros ou oligômeros de ordem superior com a mesma sequência de aminoácidos ou diferente ou outras moléculas.

[00056] Os exemplos de comprimentos de constructos de fusão são de aproximadamente 5 até 15, 20 até 25, 25 até 50, 50 até 100, 100 até 150, 150 até 200 ou 200 até 300 ou mais resíduos de aminoácidos de comprimento. Em modalidades particulares, um primeiro ou um segundo domínio inclui ou consiste em uma sequência de aminoácidos de aproximadamente 1 até 10, 10 até 20, 15 até 20, 20 até 30, 30 até 40, 40 até 50, 60 até 70, 70 até 80, 80 até 90, 90 até 100 ou mais resíduos. Em modalidades mais particulares, um primeiro domínio consiste em uma sequência de aminoácidos de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28 ou mais resíduos.

[00057] Os primeiros domínios do constructo de fusão, isoladamente ou em combinação com um segundo domínio, formam opcionalmente uma alfa-hélice anfipática. Uma alfa-hélice anfipática contém principalmente aminoácidos hidrofílicos em um lado da alfa-hélice e o outro lado contém principalmente aminoácidos hidrofóbicos. Uma vez que a alfa-hélice faz uma volta completa para cada 3,6 resíduos, a sequência de aminoácidos de uma alfa-hélice anfipática se alterna entre resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos a cada 3 até 4 resíduos. É previsto que um padrão ou um motivo de repetição PNNPNNP forme uma alfa-hélice anfipática em que P representa um resíduo de aminoácido carregado positivamente e N um resíduo de aminoácido neutro. Um padrão de repetição PNNPNNP fornece um sítio de ligação catiônica para o peptídeo lítico a uma membrana celular carregada negativamente e um sítio hidrofóbico para interação/penetração na membrana. Os constructos de fusão incluem, portanto, os primeiros domínios com um ou mais padrões ou motivos

de repetição PNNPNNP não interrompidos ou um ou mais padrões ou motivos de repetição PNNPNNP interrompidos, que podem formar uma alfa-hélice anfipática. Por exemplo, uma sequência de aminoácidos de 15 ou 18 resíduos, tal como KFAKFAKKFAKFAKK e KFAKFAKKFAKFA KKFAK, possui motivos de repetição PNNPNNP não interrompidos e interrompidos.

[00058] Um segundo domínio do constructo de fusão, tal como uma porção de direcionamento ou de ligação, inclui ou consiste em um ligante, anticorpo (ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo), antígeno, integrina, receptor de integrina (por exemplo, proteínas ou peptídeos que contêm o motivo de sequência "RGD" e componentes que podem estar presentes na matriz extracelular (ECM), tais como mono-, di- ou oligossacarídeos, ácido siálico, galactose, manose, fucose, ácido acetilneuramínico), fator de crescimento, citocina, quimiocina e porções de direcionamento e de ligação que se ligam a receptores, anticorpos, antígenos, integrinas, receptores de integrina (por exemplo, proteínas ou peptídeos que contêm motivo de sequência "RGD" e componentes que podem estar presentes na matriz extracelular (ECM), tais como mono-, di- ou oligossacarídeos, ácido siálico, galactose, manose, fucose, ácido acetilneuramínico), receptores de fator de crescimento, receptores de citocinas e receptores de quimiocinas.

[00059] Um "receptor" está tipicamente presente na superfície (por exemplo, um receptor de membrana) ou dentro de uma célula. Um receptor pode se associar com a superfície da membrana celular ou atravessar a membrana celular. Por exemplo, uma proteína receptora pode ter um domínio transmembrana que atravessa a membrana celular, opcionalmente com uma porção que é citoplasmática ou extracelular ou ambas. Os receptores incluem, portanto, receptores nativos intactos de comprimento completo que contêm uma porção

extracelular, transmembrana ou citoplasmática, bem como formas truncadas ou fragmentos das mesmas (por exemplo, uma porção extracelular, transmembrana ou citoplasmática ou uma subsequência do receptor isoladamente ou em combinação). Por exemplo, um receptor solúvel tipicamente não possui uma transmembrana e pode opcionalmente também não possuir toda ou uma parte da região extracelular ou citoplasmática nativa (se presente no receptor nativo). Tais formas e fragmentos de receptores truncados podem manter pelo menos a ligação parcial a um ligante.

[00060] Os domínios de porções de direcionamento e de ligação de constructos de fusão incluem ou consistem de qualquer entidade que se liga a um receptor, indicada como um ligante de receptor, especificamente ou não especificamente. Os exemplos não limitantes de porções de direcionamento e de ligação incluem, portanto, hormônio, um análogo de hormônio, um fragmento de um hormônio ou um análogo de hormônio que se liga a um receptor de hormônio, um fator de crescimento, um análogo de fator de crescimento, um fragmento de um fator de crescimento ou de um análogo de fator de crescimento que se liga a um receptor, um receptor de hormônio ou um ligante que se liga a um hormônio ou a um receptor de hormônio e porções de direcionamento e de ligação que se ligam a um hormônio, um análogo de hormônio, um fragmento de um hormônio ou um análogo de hormônio que se liga a um receptor de hormônio, um receptor de hormônio ou um ligante que se liga a um hormônio ou a um receptor de hormônio, fator de crescimento, análogo de fator de crescimento, um fragmento de um fator de crescimento ou análogo de fator de crescimento que se liga a um receptor, um receptor de fator de crescimento ou um ligante que se liga a um fator de crescimento ou a um receptor de fator de crescimento etc.

[00061] Os exemplos de hormônios úteis como porções de ligação

incluem hormônio de liberação de gonadotropina I, hormônio de liberação de gonadotropina II, hormônio de liberação de hormônio luteinizante III de lampreia, cadeia beta do hormônio luteinizante, hormônio luteinizante (LH), gonadotropina coriônica (CG), subunidade beta da gonadotropina coriônica (β - ou beta-CG), hormônio estimulador de melanócitos, estradiol, dietilstilbesterol, dopamina, somatostatina, hormônio estimulador de folículos (FSH), glicocorticoides, estrogênios, testosterona, androstenodiona, dihidrotestosterona, de-hidroepiandrosterona, progesteronas, androgênios e derivados dos mesmos. Os exemplos de receptores de hormônios úteis como porções de ligação incluem receptor do hormônio de liberação de gonadotropina I, receptor do hormônio de liberação de gonadotropina II, receptor do hormônio de liberação de hormônio luteinizante III de lampreia, receptor do hormônio luteinizante, receptor da gonadotropina coriônica, receptor do hormônio estimulador de melanócitos, receptor de estradiol, receptor de dopamina, receptor de somatostatina, receptor do hormônio estimulador de folículos (FSH), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), receptor de Hormônio de Crescimento (GH), receptor de Her2-neu, receptor de hormônios glicocorticoides, receptor de estrogênio, receptor de testosterona, receptor de progesterona e receptor de androgênio.

[00062] Os exemplos de fatores de crescimento incluem fator de crescimento epidérmico (EGF), Hormônio de Crescimento (GH) e Her2-neu. Os exemplos de receptores de fator de crescimento incluem receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), receptor do Hormônio de Crescimento (GH) e receptor de Her2-neu, IGF-1.

[00063] Os exemplos não limitantes específicos de porções de direcionamento ou de ligação incluem LHRH, fragmentos funcionais de LHRH (ligação) dos mesmos, análogos de LHRH e β CG, fragmentos

funcionais de β CG (ligação) dos mesmos e análogos de β CG. LHRH é um ligante completamente funcional e pode ativar efeitos farmacológicos através da interação do receptor do ligante, tal como a ativação de vias de transdução de sinal. β CG-ala é um fragmento de hCG que pode ser ligar à membrana celular sem ativar qualquer efeito farmacológico. Os exemplos não limitantes específicos de porções de direcionamento ou de ligação incluem ou consistem de uma sequência de aminoácidos dentro ou apresentada como: SYAVALSAQAALARR; SYAVALSAQAALARRA, que são fragmentos de β CG e QHWSYGLRPG, que é uma sequência de LHRH.

[00064] As porções de direcionamento e de ligação incluem ainda antígenos para ligantes expressos exclusivamente ou preferencialmente em células neoplásicas, tumorais ou cancerosas e vasos linfáticos ou sanguíneos associados com células neoplásicas, tumorais ou cancerosas. Tais antígenos podem ser convenientemente referidos como "antígenos associados ao tumor" ou "TAA" e incluem antígeno carcinoembrionário (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno específico da próstata (PSA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), CA - 125 (câncer de ovário epitelial residual), receptor de Interleucina-2 (IL-2) solúvel, RAGE-1, tirosinase, MAGE-1, MAGE-2, NY-ESO-1, Melan-A/MART-1, glicoproteína (gp) 75, gp100, beta-catenina, PRAME, MUM-1, ZFP161, Ubiquilina-1, HOX-B6, YB-1, Osteonectina e ILF3, IGF-1, para citar alguns. Outros antígenos que podem ser direcionados são CD19, CD20, CD23, CD27, CD28, CD30, CD33, CD40, CD52, CD56, CD70, CD154, receptores similares à imunoglobulina etc.

[00065] As porções de direcionamento e de ligação incluem adicionalmente transferrina, ácido fólico e derivados dos mesmos (por exemplo, folato) e membros da família de fatores de necrose de tumor (TNF) e receptores de TNF, tais como TNF-alfa, TNF-beta (linfotóxina,

LT), TRAIL, Fas, LIGHT, 41BB.

[00066] Os constructos de fusão em que um segundo domínio inclui ou consiste em um domínio de direcionamento ou de ligação podem se ligar a uma célula que produz ou expressa um antígeno, um receptor ou um ligante, uma integrina, um anticorpo ou um antígeno ou TAA ao qual o segundo domínio se liga. Os exemplos não limitantes de células incluem células hiperproliferativas e células que exibem hiperproliferação aberrante ou indesejável. Em exemplos não limitantes particulares, tais células incluem células neoplásicas, cancerosas, tumorais e malignas não metastáticas e metastáticas, bem como células neoplásicas, cancerosas, tumorais e malignas disseminadas e células neoplásicas, cancerosas, tumorais e malignas dormentes. As células que expressam um antígeno, um receptor, um ligante, uma integrina, TAA etc., em níveis elevados em relação a células normais ou não hiperproliferativas fornecem seletividade para tais células. Assim, uma porção de direcionamento ou de ligação pode se ligar a um antígeno, um receptor, um ligante, uma integrina ou TAA que é expresso na ou produzido por uma célula hiperproliferativa (por exemplo, neoplasias, cânceres, tumores e malignidades não metastáticos ou metastáticos e células neoplásicas, cancerosas, tumorais e malignas disseminadas e dormentes), mas não é expresso de forma detectável ou é produzido ou expresso em níveis relativamente menores por uma célula normal ou não hiperproliferativa, direcionando assim preferencialmente células hiperproliferativas. Os exemplos não limitantes de tipos de células e tecidos que expressam um antígeno, um receptor, um ligante, uma integrina ou TAA incluem uma célula de mama, ovário, útero, cervical, próstata, testículo, adrenal, pituitária, pancreática, hepática, gastrointestinal, de pele, muscular ou endometrial.

[00067] Os exemplos adicionais de porções de ligação incluem

anticorpos e fragmentos de anticorpos. Um "anticorpo" refere-se a qualquer molécula de imunoglobulina monoclonal ou policlonal, tal como IgM, IgG, IgA, IgE, IgD e qualquer subclasse das mesmas. Os exemplos de subclasses para IgG são IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Os anticorpos incluem aqueles produzidos por ou expressos nas células, tais como células B. Um fragmento ou uma subsequência de anticorpo refere-se a uma porção de um anticorpo de comprimento completo que mantém capacidade de ligação ao antígeno pelo menos parcial de um anticorpo de comprimento completo de comparação. Os exemplos de fragmentos de anticorpos incluem Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, Fv de cadeia isolada (scFv), Fvs ligados por dissulfeto (sdFv), V_L, V_H, (Fab₃) triespecífico, (Fab₂) biespecífico, dianticorpo ((V_L-V_H)₂ ou (V_H-V_L)₂), trianticorpo (trivalente), tetranticorpo (tetraivalente), minianticorpo ((scFv-CH₃)₂), Fv de cadeia isolada biespecífico (Bis-scFv), IgGdeltaCH₂, scFv-Fc, (scFv)₂-Fc ou outro fragmento que se liga ao antígeno de uma imunoglobulina intacta.

[00068] Os constructos de fusão incluem aqueles com um primeiro domínio no terminal amino e um segundo domínio no terminal carboxila. Os constructos de fusão incluem ainda aqueles com um primeiro domínio no terminal carboxila e um segundo domínio no terminal amino. Quando domínios adicionais estão presentes (por exemplo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo etc. domínios), um primeiro domínio fica posicionado no terminal NH₂ em relação a um segundo domínio ou um segundo domínio fica posicionado no terminal NH₂ em relação a um primeiro domínio.

[00069] As subsequências e as substituições de aminoácidos das várias sequências apresentadas aqui, tais como, KFAKFA KFAKFAKK, KFAKFA KFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKF AKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAK KFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKF AKFAKKFAKFAK ou

uma porção de ligação, são também incluídas. Em modalidades particulares, uma subsequência de um primeiro ou um segundo domínio possui pelo menos 5 até 10, 10 até 15, 15 até 20, 20 até 25, 25 até 30, 30 até 35 ou mais resíduos de aminoácidos.

[00070] A invenção inclui, portanto, modificações ou variações, tais como substituições, adições ou deleções de um primeiro ou um segundo domínio ou tanto do primeiro quanto do segundo domínios. Assim, um constructo de fusão que inclui um primeiro ou um segundo domínio da sequência peptídica pode incorporar qualquer número de substituições de aminoácidos conservativas ou não conservativas, contanto que tais substituições não destruam a atividade (lítica ou de ligação) do primeiro ou do segundo domínio. Assim, por exemplo, uma porção lítica modificada (primeiro domínio) pode manter atividade lítica pelo menos parcial, tal como morte celular ou apoptose, de um primeiro domínio não modificado e uma porção de ligação modificada ou um imitador do mesmo pode manter uma atividade de ligação pelo menos parcial de uma porção de ligação não modificado.

[00071] Uma "substituição conservativa" é uma substituição de um aminoácido por um resíduo biologicamente, quimicamente ou estruturalmente similar. Biologicamente similar significa que a substituição é compatível com uma atividade biológica, por exemplo, atividade lítica. Estruturalmente similar significa que os aminoácidos possuem cadeias laterais com comprimento similar, tais como alanina, glicina e serina ou que possuem tamanho similar ou a estrutura de um primeiro, um segundo ou um domínio adicional é mantida, tal como uma alfa-hélice anfipática. Similaridade química significa que os resíduos possuem a mesma carga ou que são ambos hidrofílicos ou hidrofóbicos. Os exemplos particulares incluem a substituição de um resíduo hidrofóbico, tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina por um outro ou a substituição de um resíduo polar por um outro, tal

como a substituição de arginina por lisina, ácido glutâmico por aspártico ou glutamina por asparagina, serina por treonina etc. Os ensaios de rotina podem ser utilizados para determinar se uma variação de constructo de fusão possui atividade, por exemplo, atividade lítica ou atividade de ligação.

[00072] Os exemplos específicos incluem uma substituição ou uma deleção de um ou mais resíduos de aminoácidos (por exemplo, 1-3, 3-5, 5-10, 10-20 ou mais) de um primeiro ou um segundo domínio peptídico. Um constructo de fusão modificado pode ter uma sequência peptídica com 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou mais identidade com uma sequência de referência (por exemplo, um primeiro domínio, tal como KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAK KFA, KFAKFAKKFA KFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFA KFAKKFAKFA ou KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK ou um segundo domínio tal como uma porção de ligação.

[00073] Em uma modalidade particular, um constructo de fusão inclui um primeiro domínio peptídico que inclui ou consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D de 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 resíduos que inclui um peptídeo selecionado de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKK FAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKF AK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAK KFAKFAKKFAKFAKK FAKFAK que possui um ou mais dos resíduos K substituídos por um resíduo F ou L, um ou mais dos resíduos F substituídos por um resíduo K, A ou L ou um ou mais dos resíduos A substituídos por um resíduo K, F ou L. Em outra modalidade particular, um constructo de fusão inclui um primeiro domínio peptídico que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKF AKKF, KFAKFAKKFA

KFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAK FAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK que possui um ou mais dos resíduos K substituídos por um resíduo F ou L, um ou mais dos resíduos F substituídos por um resíduo K, A ou L ou um ou mais dos resíduos A substituídos por um resíduo K, F ou L; e um segundo domínio peptídico que inclui ou consiste em uma porção de ligação. Em uma modalidade particular adicional, um constructo de fusão inclui ou consiste em um primeiro domínio peptídico que consiste em uma sequência de aminoácidos L ou D selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKF AKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAKF AKKFAKFAK que possui um ou mais dos resíduos K substituídos por qualquer um de um resíduo F ou L, um ou mais dos resíduos F substituídos por qualquer um de um resíduo K, A ou L ou um ou mais dos resíduos A substituídos por qualquer um de um resíduo K, F ou L e um segundo domínio peptídico que consiste em uma sequência de 1-25 aminoácidos L ou D (por exemplo, porção de ligação) distinta do primeiro domínio.

[00074] Os termos "identidade" e "homologia" e variações gramaticais dos mesmos significam que duas ou mais entidades referidas são as mesmas. Assim, quando duas sequências de aminoácidos forem idênticas, estas possuem a mesma sequência de aminoácidos. "Áreas, regiões ou domínios de identidade" significam que uma porção de duas ou mais entidades referidas é a mesma. Assim, quando duas sequências de aminoácidos forem idênticas ou homólogas em relação a uma ou mais regiões de sequência, estas compartilham identidade nestas regiões. O termo "complementar", quando utilizado em referência a uma sequência de ácido nucleico significa que as regiões referidas são 100% complementares, isto é,

exibem 100% de pareamento de bases sem pareamentos errados.

[00075] Devido à variação na quantidade de conservação de sequência entre proteínas estruturalmente e funcionalmente relacionadas, a quantidade de identidade de sequência necessária para manter uma função ou uma atividade (por exemplo, lítica ou de ligação) depende da proteína, da região e da função ou atividade de tal região. Por exemplo, para uma sequência peptídica lítica podem estar presentes vários padrões ou motivos de repetição de sequências PNNPNNP, mas um ou mais padrões ou motivos de repetição de sequências PNNPNNP interrompidos ou não interrompidos não precisam estar presentes.

[00076] A extensão de identidade entre duas sequências pode ser determinada utilizando um programa de computador e um algoritmo matemático conhecidos na técnica. Tais algoritmos que calculam a porcentagem de identidade de sequência (homologia) geralmente são responsáveis pelos espaços (gaps) e pareamentos errados de sequências ao longo da região de comparação. Por exemplo, um algoritmo de busca BLAST (por exemplo, BLAST 2.0) (ver, por exemplo, Altschul e outros, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990), disponível publicamente através do NCBI) possui os exemplos de parâmetros de busca como a seguir: Pareamento errado -2; abertura do gap 5; extensão do gap 2. Para comparações de sequências polipeptídicas, é tipicamente utilizado um algoritmo BLASTP em combinação com uma matriz de obtenção de escore, tal como PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 ou BLOSUM 50. Os programas de comparação de sequências FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) e SSEARCH também são utilizados para quantificar a extensão de identidade (Pearson e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988); Pearson, *Methods Mol Biol.* 132:185 (2000); e Smith e outros, *J. Mol. Biol.* 147:195 (1981)). Também foram desenvolvidos programas para a quantificação da

similaridade estrutural de proteínas utilizando o mapeamento topológico baseado em Delaunay (Bostick e outros, *Biochem Biophys Res Commun.* 304:320 (2003)).

[00077] Os resíduos individuais e o primeiro, o segundo e domínios adicionais podem ser ligados através de uma ligação covalente ou não covalente. Os exemplos não limitantes de ligações covalentes são ligações amida, ligações químicas não naturais e sem ser amida, que incluem, por exemplo, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, maleimidas bifuncionais, N,N'-díciclo-hexilcarbodi-imida (DCC) ou N,N'-di-isopropilcarbodi-imida (DIC). Os grupos de ligação alternativos às ligações amida incluem, por exemplo, cetometileno (por exemplo, -C(=O)-CH₂- para -C(=O)-NH-), aminometileno (CH₂-NH), etileno, olefina (CH=CH), éter (CH₂-O), tioéter (CH₂-S), tetrazol (CN₄-), tiazol, retroamida, tioamida ou éster (ver, por exemplo, Spatola (1983) em Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, PP. 267-357, "Peptide and Backbone Modifications", Marcel Decker, NY).

[00078] O primeiro e o segundo domínios podem ser fundidos ou unidos imediatamente adjacente um do outro através de uma ligação covalente ou uma não covalente. O primeiro e o segundo domínios podem ser separados por uma região intermediária, tal como uma dobradiça, um espaçador ou um ligante posicionado entre um primeiro e um segundo domínio. Em uma modalidade, um primeiro e um segundo domínios são ligados por uma cadeia de carbono. Cadeias de vários carbonos incluem ácidos carboxílicos (por exemplo, ácidos dicarboxílicos) tais como ácido glutárico, ácido succínico e ácido adípico.

[00079] Em outra modalidade, um primeiro e um segundo domínios são ligados por um aminoácido, um peptídeo ou uma dobradiça não peptídica, um espaçador ou um ligante posicionado entre o primeiro e

o segundo domínios. As sequências de dobradiça, espaçadoras ou ligantes peptídicas podem ter qualquer comprimento, mas tipicamente variam de aproximadamente 1-10, 10-20, 20-30, 30-40 ou 40-50 resíduos de aminoácidos. Em modalidades particulares, uma dobradiça, um espaçador ou um ligante peptídico posicionado entre um primeiro e um segundo domínios possui de 1 até 25 resíduos de aminoácidos L ou D ou 1 até 6 resíduos de aminoácidos L ou D. Os resíduos de aminoácidos particulares que são incluídos nas sequências posicionadas entre o primeiro e o segundo domínios incluem um ou mais de resíduos de aminoácidos C, A, S ou G. Os exemplos não limitantes específicos de peptídeos posicionados entre o primeiro e o segundo domínios incluem uma sequência dentro ou apresentada como: GSGGS, ASAAS ou CCCCCC. Os derivados de aminoácidos e peptídeos podem ser posicionados entre o primeiro e o segundo domínios. Um exemplo não limitante específico de um derivado de aminoácido é um derivado de lisina ou um ligante de 6 carbonos tal como o ácido α -amino-caproico.

[00080] Os constructos de fusão com ou sem uma dobradiça, um espaçador ou um ligante ou um terceiro, um quarto, um quinto, um sexto, um sétimo etc. domínio podem ser compostas totalmente de aminoácidos naturais ou sintéticos, aminoácidos não naturais ou análogos de aminoácidos ou podem incluir formas derivatizadas. Em várias modalidades, um constructo de fusão inclui em um primeiro ou em um segundo domínio um ou mais D-aminoácidos substituídos por L-aminoácidos, misturas de D-aminoácidos e L-aminoácidos ou uma sequência composta inteiramente de resíduos de D-aminoácidos.

[00081] Os constructos de fusão podem conter qualquer combinação de componentes estruturais não naturais, que são tipicamente de três grupos estruturais: a) grupos de ligação ao resíduo sem ser as ligações de ligação amida natural ("ligação peptídica"); b)

resíduos não naturais no lugar de resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente; ou c) resíduos que induzem mimetismo estrutural secundário, isto é, induzem ou estabilizam uma estrutura secundária, por exemplo, uma conformação em alfa-hélice. Os constructos de fusão incluem estruturas cíclicas tais como uma ligação amida extremidade-a-extremidade entre o terminal amino e carbóxi da molécula ou ligação(ões) dissulfeto intra- ou intermolecular(es). Os constructos de fusão podem ser modificadas *in vitro* ou *in vivo*, por exemplo, modificadas pós-tradução para incluírem, por exemplo, resíduos de açúcar ou carboidrato, grupos fosfato, ácidos graxos, lipídeos etc.

[00082] Os exemplos específicos de uma adição incluem um terceiro, um quarto, um quinto, um sexto ou um sétimo domínio. Os constructos de fusão com um primeiro e um segundo domínios incluem, portanto, um ou mais domínios adicionais (terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo etc.) ligados covalentemente aos mesmos para conferir uma função ou uma atividade distinta ou complementar. Os exemplos de domínios adicionais incluem domínios que facilitam o isolamento, que incluem, por exemplo, peptídeos que quelam metais tais como extensões de poli-histidina e módulos de histidina-triptofano que permitem a purificação sobre metais imobilizados; domínios de proteína A que permitem a purificação sobre imunoglobulina imobilizada; e domínio utilizado no sistema de purificação por extensão/afinidade FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA). A inclusão opcional de uma sequência que pode ser clivada tal como o Fator Xa ou a enteroquinase entre um domínio de purificação e o constructo de fusão pode ser utilizada para facilitar a purificação. Por exemplo, um vetor de expressão pode incluir uma sequência de ácido nucleico que codifica um constructo de fusão ligada a seis resíduos de histidina seguida por uma tiorredoxina e um sítio de clivagem de enteroquinase.

Os resíduos de histidina facilitam a detecção e a purificação do constructo de fusão enquanto que o sítio de clivagem de enteroquinase fornece um meio para a purificação do constructo do restante da proteína (ver, por exemplo, Kroll, *DNA Cell. Biol.* 12:441 (1993)).

[00083] A atividade do constructo de fusão pode ser afetada por vários fatores e, portanto, os constructos de fusão podem ser planejadas ou otimizadas levando em consideração um ou mais destes fatores. Tais fatores incluem, por exemplo, o comprimento de um constructo de fusão, que pode afetar a toxicidade em relação às células. Em particular, foi observada maior citotoxicidade quando Phor21- β CG-ala e Phor21 foram comparadas com Phor14- β CG-ala. A atividade de matar células de domínios peptídicos líticos que formam a alfa-hélice também pode depender da estabilidade da hélice. A dobradiça e os espaçadores podem afetar a interação de membrana de um primeiro domínio e a estrutura em hélice de um domínio peptídico lítico. Por exemplo, constructos de fusão mais curtos, tais como constructos menores que 21 aminoácidos que incluem opcionalmente um espaçador ou uma dobradiça, podem exibir maior citotoxicidade devido à maior estabilidade da hélice. Em particular, espaçadores tais como ASAAS e o ácido 6 aminocaproico tendem a aumentar a toxicidade de constructos de fusão mais curtos. A carga dos domínios peptídicos líticos, que é determinada, em parte, pelos resíduos de aminoácidos particulares presentes no domínio, também afeta a potência de morte celular.

[00084] O posicionamento da porção de ligação em relação ao domínio lítico (terminal N ou C) também pode afetar a atividade de matar células de constructos de fusão. Por exemplo, uma porção de ligação posicionada no terminal C em relação ao domínio lítico tinha maior atividade de matar células que se posicionado no terminal N em

relação ao domínio lítico.

[00085] A meia-vida *in vivo* do constructo de fusão pode ser aumentada através do constructo de domínios peptídicos do constructos de fusão com um ou mais aminoácidos que não ocorrem naturalmente ou derivados. Por exemplo, os constructos de fusão com D-aminoácidos (por exemplo, até 30% ou mais de todos os resíduos são D-enanciômeros) são resistentes à proteólise do soro e, portanto, podem ser ativas ao longo de períodos de tempo mais longos aumentando assim a potência *in vivo*. Além disso, o constructo de domínios peptídicos de constructos de fusão com um ou mais aminoácidos que não ocorrem naturalmente ou derivados pode reduzir a atividade hemolítica. Tais constructos de fusão com D-enanciômeros também possuem uma maior tendência de serem monoméricas em solução - não se agregam de forma significativa.

[00086] De acordo com a invenção, são fornecidos constructos de fusão que possuem maior atividade antiproliferativa de células que uma ou mais de Phor21- β CG-ala, Phor21-GSGGS- β CG-ala, Phor21-ASAAS- β CG-ala ou Phor 14- β CG-ala, que é determinada por um valor de IC₅₀ menor, que representa a quantidade de constructo de fusão necessária para atingir a citotoxicidade celular. De acordo com a invenção, são também fornecidos constructos de fusão que possuem menos atividade hemolítica, que é representada pela proporção IC₅₀/HA₅₀ (atividade hemolítica), que Phor21- β CG-ala, Phor21-GSGGS- β CG-ala, Phor21-ASAAS- β CG-ala ou Phor 14- β CG-ala. De acordo com a invenção, são adicionalmente fornecidos constructos de fusão que possuem uma atividade hemolítica, que é representada pela proporção IC₅₀/HA₅₀ (atividade hemolítica), menor que aproximadamente 0,02, 0,01 ou 0,005. As condições de ensaio representativas para a determinação da citotoxicidade celular e da atividade hemolítica são apresentadas no Exemplo 1.

[00087] Os peptídeos e os miméticos de peptídeos podem ser produzidos e isolados utilizando métodos conhecidos na técnica. Os peptídeos podem ser sintetizados, inteiros ou em parte, utilizando métodos químicos conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Caruthers (1980). *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215; Horn (1980); e Banga, A.K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA). A síntese de peptídeos pode ser realizada utilizando várias técnicas em fase sólida (ver, por exemplo, Roberge *Science* 269:202 (1995); Merrifield, *Methods Enzymol.* 289:3(1997)) e a síntese automatizada pode ser conseguida, por exemplo, utilizando o ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos e os miméticos de peptídeos também podem ser sintetizados utilizando metodologias combinatórias. Os resíduos sintéticos e os polipeptídeos que incorporam miméticos podem ser sintetizados utilizando uma variedade de procedimentos e metodologias conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman e outros (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY). Os peptídeos modificados podem ser produzidos através de métodos de modificação química (ver, por exemplo, Belousov, *Nucleic Acids Res.* 25:3440 (1997); Frenkel, *Free Radic. Biol. Med.* 19:373 (1995); e Blommers, *Biochemistry* 33:7886 (1994).

[00088] A invenção fornece ainda ácidos nucleicos que codificam os constructos de fusão da invenção e vetores que incluem o ácido nucleico que codifica os constructos de fusão. Em uma modalidade particular, um ácido nucleico codifica um constructo de fusão que inclui um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos de 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 resíduos que inclui uma sequência peptídica selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KF AKFAKKF

AKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFA KF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK e um segundo domínio que inclui ou consiste em uma porção de direcionamento ou de ligação. Em outra modalidade, um ácido nucleico codifica um constructo de fusão que inclui um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFA KFAKFAKKF, KFAKFAKKF AKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKF AKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKF AKFAKKF AKFAK e um segundo domínio que inclui ou consiste em uma porção de direcionamento ou de ligação. Em uma modalidade adicional, um ácido nucleico codifica um constructo de fusão que inclui ou consiste em um primeiro domínio que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada de KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAK KFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFA KKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKF AKFAKKFAKFA e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK e um segundo domínio que consiste em uma sequência de 1-25 aminoácidos (por exemplo, porção de direcionamento ou de ligação) distinto do dito primeiro domínio.

[00089] Ácido nucleico, que também pode ser referido aqui como um gene, um polinucleotídeo, uma sequência de nucleotídeos, um iniciador, um oligonucleotídeo ou uma sonda refere-se a polímeros que contêm purina e pirimidina naturais ou modificados de qualquer comprimento, polirribonucleotídeos ou polidesoxirribonucleotídeos ou polirribo-polidesoxirribonucleotídeos mistos e formas α -anoméricas dos mesmos. Os dois ou mais polímeros que contêm purina e pirimidina são tipicamente ligados por uma ligação fosfoéster ou um análogo da mesma. Os termos podem ser utilizados de forma intercambiável para se referir a todas as formas de ácido nucleico, que

inclui ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Os ácidos nucleicos podem ser de filamento simples, duplo ou triplo, linear ou circular. Os ácidos nucleicos incluem DNA genômico, cDNA e antissenso. O ácido nucleico RNA pode ser mRNA processado ou não processado, rRNA, tRNA ou antissenso. Os ácidos nucleicos incluem nucleotídeos que ocorrem naturalmente, sintéticos, bem como análogos e derivados.

[00090] Como um resultado da degeneração do código genético, os ácidos nucleicos incluem sequências degeneradas em relação às sequências que codificam os constructos de fusão da invenção. Assim, são fornecidas as sequências de ácidos nucleicos degeneradas que codificam os constructos de fusão.

[00091] O ácido nucleico pode ser produzido utilizando qualquer uma de uma variedade de métodos de clonagem e de síntese química padronizados conhecidos e pode ser alterado intencionalmente através de mutagênese direcionada ao sítio ou outras técnicas recombinantes conhecidas por um versado na técnica. A pureza dos polinucleotídeos pode ser determinada através de sequenciamento, eletroforese em gel, espectrometria por UV.

[00092] Os ácidos nucleicos podem ser inseridos em um constructo de ácido nucleico em que a expressão do ácido nucleico é influenciada ou regulada por um "elemento de controle da expressão", referido aqui como um "cassete de expressão". O termo "elemento de controle da expressão" refere-se a um ou mais elementos de sequência de ácido nucleico que regulam ou influenciam a expressão de uma sequência de ácido nucleico à qual estão ligados de forma operacional. Um elemento de controle da expressão pode incluir, quando apropriado, promotores, intensificadores, terminadores da transcrição, silenciadores gênicos, um códon de início (por exemplo, ATG) na frente de um gene que codifica proteína etc.

[00093] Um elemento de controle da expressão ligado de forma operacional a uma sequência de ácido nucleico controla a transcrição e, quando apropriado, a tradução da sequência de ácido nucleico. O termo "ligado de forma operacional" refere-se a uma justaposição em que os componentes referidos estão em uma relação que os permite funcionar de sua maneira pretendida. Tipicamente os elementos de controle da expressão estão justapostos nas extremidades a 5' ou a 3' dos genes, mas também podem ser intrônicos.

[00094] Os elementos de controle da expressão incluem elementos que ativam a transcrição de forma constitutiva, que podem ser induzidos (isto é, requerem um sinal externo para a ativação) ou que podem ser desreprimidos (isto é, requerem um sinal para desligar a transcrição; quando o sinal não está mais presente, a transcrição é ativada ou "desreprimida"). São ainda incluídos nos cassetes de expressão da invenção elementos de controle suficientes para tornar a expressão gênica controlável em relação a certos tipos de células ou tecidos (isto é, elementos de controle específicos ao tecido). Tipicamente, tais elementos ficam localizados a montante ou a jusante (isto é, a 5' e a 3') da sequência codificadora. Os promotores ficam geralmente posicionados a 5' da sequência codificadora. Os promotores, produzidos através de técnicas de DNA recombinante ou sintéticas, podem ser utilizados para fornecer a transcrição dos polinucleotídeos da invenção. Um "promotor" é entendido como um elemento de sequência mínima suficiente para direcionar a transcrição.

[00095] Os ácidos nucleicos podem ser inseridos em um plasmídeo para propagação em uma célula hospedeira e para a manipulação genética subsequente, se desejado. Um plasmídeo é um ácido nucleico que pode ser propagado de forma estável em uma célula hospedeira; os plasmídeos podem conter opcionalmente elementos de

controle da expressão com a finalidade de controlar a expressão do ácido nucleico. Um vetor é utilizado aqui de forma sinonimicamente com um plasmídeo e pode incluir ainda um elemento de controle da expressão para expressão em uma célula hospedeira. Os plasmídeos e os vetores contêm geralmente pelo menos uma origem de replicação para propagação em uma célula e um promotor. Os plasmídeos e os vetores são, portanto, úteis para a manipulação genética de constructo de fusão que codifica ácidos nucleicos, para a produção de constructos de fusão ou ácido nucleico antissenso e para a expressão de constructos de fusão em células hospedeiras e organismos, por exemplo.

[00096] Os promotores de sistemas bacterianos incluem T7 e promotores que podem ser induzidos tais como pL do bacteriófago λ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) e promotores que respondem à tetraciclina. Os promotores de sistemas de células de insetos incluem promotores constitutivos ou que podem ser induzidos (por exemplo, ecdysone). Os promotores constitutivos de células de mamífero incluem SV40, RSV, vírus papiloma bovino (BPV) e outros promotores virais ou promotores que podem ser induzidos derivados do genoma de células de mamífero (por exemplo, promotor da metalotioneína IIA; promotor de choque térmico) ou de vírus de mamífero (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus; a repetição terminal longa do vírus de tumor mamário de camundongo que pode ser induzida). Alternativamente, um genoma retroviral pode ser modificado geneticamente para a introdução e para direcionar a expressão de um constructo de fusão em células hospedeiras apropriadas.

[00097] Os sistemas de expressão incluem ainda vetores planejados para uso *in vivo*. Os exemplos não limitantes particulares incluem vetores adenovirais (Patentes U.S. N^{os} 5.700.470 e

5.731.172), vetores associados à adeno (Patente U.S. Nº 5.604.090), vetores de vírus herpes simplex (Patente U.S. Nº 5,501,979), vetores retrovirais (Patentes U.S. Nºs 5.624.820, 5.693.508 e 5.674.703), vetores de BPV (Patente U.S. Nº 5.719.054) e vetores de CMV (Patente U.S. Nº 5.561.063).

[00098] Os vetores de levedura incluem promotores constitutivos e que podem ser induzidos (ver, por exemplo, Ausubel e outros, Em: Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Cap. 13, ed., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988; Grant e outros Methods in Enzymology, 153:516 (1987), eds. Wu & Grossman; Bitter Methods in Enzymology, 152:673 (1987), eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y.; e, Strathern e outros, The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces (1982) eds. Cold Spring Harbor Press, Vols. I e II). Um promotor de levedura constitutivo tal como ADH ou LEU2 ou um promotor que pode ser induzido tal como GAL pode ser utilizado (R. Rothstein Em: DNA Cloning, A Practical Approach, Vol.11, Cap. 3, ed. D.M. Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986). Os vetores que facilitam a integração de sequências de ácidos nucleicos estranhas em um cromossomo de levedura, através de recombinação homóloga, por exemplo, são conhecidos na técnica. Os cromossomos artificiais de levedura (YAC) são tipicamente utilizados quando os polinucleotídeos inseridos são muito grandes para vetores mais convencionais (por exemplo, maiores que aproximadamente 12 Kb).

[00099] Os vetores de expressão contêm ainda um marcador que pode ser selecionado que confere resistência a uma pressão seletiva ou um marcador que pode ser identificado (por exemplo, beta-galactosidase), permitindo assim que as células que possuem o vetor que será selecionado cresçam e se exapandam. Alternativamente, um marcador que pode ser selecionado pode estar em um segundo vetor que é cotransfectado em uma célula hospedeira com um primeiro vetor

que contém um ácido nucleico que codifica um constructo de fusão.

[000100] Os sistemas de seleção incluem, mas não estão limitados ao gene de timidina quinase do vírus herpes simplex (Wigler e outros, *Cell* 11:223 (1977)), ao gene de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (Szybalska e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962)) e aos genes de adenina fosforribosiltransferase (Lowy e outros, *Cell* 22:817 (1980)) que podem ser empregados em células *tk⁻*, *hgp^rt⁻* ou *ap^rt⁻*, respectivamente. Adicionalmente, a resistência a antimetabólitos pode ser utilizada como a base de seleção para *dhfr*, que confere resistência ao metotrexato (O'Hare e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); o gene *gpt*, que confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); o gene da *neomicina*, que confere resistência ao aminoglicosídeo G-418 (Colberre-Garapin e outros, *J. Mol. Biol.* 150:1(1981)); *puromicina*; e o gene da *higromicina*, que confere resistência à higromicina (Santerre e outros, *Gene* 30:147 (1984)). Os genes que podem ser selecionados adicionais incluem *trpB*, que permite que as células utilizem indol no lugar de triptofano; *hisD*, que permite que células utilizem histinol no lugar de histidina (Hartman e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047 (1988)); e ODC (ornitina decarboxilase), que confere resistência ao inibidor da ornitina decarboxilase, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue (1987) Em: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory).

[000101] As células hospedeiras que expressam constructos de fusão e as células hospedeiras transformadas com ácidos nucleicos que codificam constructos de fusão e os vetores que incluem um ácido nucleico que codifica o constructo de fusão também são fornecidos. Em uma modalidade, uma célula hospedeira é uma célula procariótica. Em outra modalidade, uma célula hospedeira é uma célula eucariótica.

Em vários aspectos, a célula eucariótica é uma célula de levedura ou de mamífero (por exemplo, humana, de primata etc.).

[000102] Como utilizado aqui, uma "célula hospedeira" é uma célula na qual é introduzido um ácido nucleico que pode ser propagado, transcrito ou codificado pelo constructo de fusão expressa. O termo inclui ainda qualquer progênie ou subclones da célula hospedeira. As células hospedeiras incluem células que expressam o constructo de fusão e células que não expressam o constructo de fusão. As células hospedeiras que não expressam um constructo de fusão são utilizadas para propagar o ácido nucleico ou o vetor que inclui um ácido nucleico que codifica um constructo de fusão ou um antissenso.

[000103] As células hospedeiras incluem, mas não estão limitadas a micro-organismos tais como bactérias e leveduras; e células vegetais, de inseto e de mamífero. Por exemplo, bactérias transformadas com um ácido nucleico de bacteriófago recombinante, ácido nucleico de plasmídeo ou vetores de expressão de ácido nucleico de cosmídeo; levedura transformada com vetores de expressão de levedura recombinantes; sistemas de células vegetais infectados com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, vírus mosaico da couve-flor, CaMV; vírus mosaico do tabaco, TMV) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeos recombinantes (por exemplo, plasmídeo Ti); sistemas de células de insetos infectados com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, baculovírus); e sistemas de células animais infectadas com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, retrovírus, adenovírus, vírus vaccínia) ou sistemas de células animais transformadas engenheirados para a propagação ou a expressão transitória ou estável.

[000104] Os constructos de fusão, os ácidos nucleicos que codificam constructos de fusão, os vetores e as células hospedeiras que

expressam os constructos de fusão ou transformados com os ácidos nucleicos que codificam os constructos de fusão e antissenso incluem formas isoladas e purificadas. O termo "isolada", quando utilizado como um modificador de uma composição da invenção, significa que a composição é produzida pela mão humana ou está separada, substancialmente completamente ou pelo menos em parte, do que ocorre naturalmente no ambiente *in vivo*. Geralmente, uma composição isolada é substancialmente livre de um ou mais materiais com os quais está normalmente associada na natureza, por exemplo, uma ou mais proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos, membranas celulares. O termo "isolada" não exclui formas físicas alternativas da composição, tais como multímeros/oligômeros, variações, modificações ou formas derivatizadas ou formas expressas em células hospedeiras produzidas pela mão humana. O termo "isolada" também não exclui formas (por exemplo, formulações farmacêuticas e composições de combinação) em que há combinações ali, das quais qualquer uma é produzida pela mão humana.

[000105] Uma composição "isolada" pode também ser "purificada" quando livre de parte, um número substancial de, de maior parte ou de todos os materiais com os quais se associa tipicamente na natureza. Assim, um constructo de fusão isolado que também é substancialmente puro não inclui polipeptídeos ou polinucleotídeos presentes entre milhões de outras sequências, tais como proteínas de uma biblioteca de proteínas ou ácidos nucleicos em uma biblioteca genômica ou de cDNA, por exemplo. Uma composição "purificada" pode ser combinada com uma ou mais outras moléculas.

[000106] De acordo com a invenção, são fornecidas misturas de constructos de fusão e composições de combinação. Em uma modalidade, uma mistura inclui um ou mais constructos de fusão e um

veículo ou um excipiente farmacologicamente aceitável. Em outra modalidade, uma mistura inclui um ou mais constructos de fusão e um tratamento ou agente antiproliferativo de células, antitumor, anticâncer ou antineoplásico. Em uma modalidade adicional, uma mistura inclui um ou mais constructos de fusão e um agente de aprimoramento do sistema imunológico. Combinações, tais como um ou mais constructos de fusão em um veículo ou um excipiente farmacologicamente aceitável, com um ou mais de um tratamento ou um agente antiproliferativo de células, antitumor, anticâncer ou antineoplásico e um tratamento ou um agente de aprimoramento do sistema imunológico, também são fornecidas.

[000107] Os constructos de fusão da invenção, tais como polipeptídeos que possuem uma sequência de aminoácidos que inclui um primeiro domínio lítico e um segundo domínio de porção de ligação, podem ser utilizadas para direcionar as células para lise, para morte celular ou para apoptose. Tais células podem ser direcionadas de forma seletiva. Por exemplo, uma célula que expressa um receptor, um ligante, um antígeno ou um anticorpo pode ser direcionada através de um constructo de fusão e é dessa maneira preferencialmente morta comparada com as células que expressam menos do receptor, do ligante, do antígeno ou do anticorpo.

[000108] De acordo com a invenção, são fornecidos métodos de redução ou de inibição da proliferação de uma célula e métodos de redução ou de inibição da proliferação celular. Em uma modalidade, um método inclui o contato de uma célula com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula. Em outra modalidade, um método inclui o contato de uma célula com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação celular.

[000109] São também fornecidos métodos de redução ou de inibição

da proliferação de uma célula hiperproliferativa e métodos de redução ou de inibição da proliferação de células hiperproliferativas. Em uma modalidade, um método inclui o contato de uma célula hiperproliferativa ou células hiperproliferativas com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação.

[000110] São adicionalmente fornecidos métodos de redução ou de inibição da proliferação de uma célula neoplásica, cancerosa, tumoral e maligna não metastática ou metastática. Em uma modalidade, um método inclui o contato de uma célula neoplásica, cancerosa, tumoral ou maligna com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula.

[000111] São ainda adicionalmente fornecidos métodos de redução ou de inibição da proliferação de uma célula neoplásica, cancerosa, tumoral e maligna não metastática ou metastática dormente ou que não está em divisão. Em uma modalidade, um método inclui o contato de uma célula neoplásica, cancerosa, tumoral ou maligna dormente ou que não está em divisão com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula dormente ou que não está em divisão.

[000112] São adicionalmente fornecidos métodos de redução ou de inibição seletiva da proliferação de uma célula (por exemplo, uma célula hiperproliferativa) que expressa um receptor, um ligante, um anticorpo ou um antígeno. Em uma modalidade, um método inclui o contato da célula com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula (por exemplo, célula hiperproliferativa), em que a porção de ligação do dito peptídeo se liga ao receptor, ao ligante, ao anticorpo ou ao antígeno expresso pela célula.

[000113] São ainda adicionalmente fornecidos métodos de redução ou de inibição seletiva da proliferação de uma célula neoplásica,

tumoral, cancerosa ou maligna que expressa um receptor, um ligante, um anticorpo ou um antígeno. Em uma modalidade, um método inclui o contato da célula com um constructo de fusão em uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir a proliferação da célula neoplásica, tumoral, cancerosa ou maligna, em que a porção de ligação do dito constructo de fusão se liga ao receptor, ao ligante, ao anticorpo ou ao antígeno expresso pela célula.

[000114] O termo "contato" significa a ligação ou a interação direta ou indireta entre duas ou mais entidades (por exemplo, entre um constructo de fusão e uma célula). O contato como utilizado aqui inclui em solução, em fase sólida, *in vitro*, *ex vivo*, em uma célula e *in vivo*. O contato *in vivo* pode ser referido como administrando ou uma administração.

[000115] As células para direcionamento para reduzir ou inibir a proliferação, de forma não seletiva ou de forma seletiva, incluem células que expressam qualquer molécula à qual a porção de ligação do constructo de fusão se liga. Os exemplos de células incluem uma célula que expressa um receptor (por exemplo, um receptor de hormônio, um receptor de fator de crescimento, um receptor de citocina, um receptor de quimiocina), um ligante (por exemplo, um hormônio, um fator de crescimento, uma citocina, uma quimiocina) ou um anticorpo ou um antígeno ou uma integrina ou um receptor de integrina (peptídeos que contêm o motivo de sequência "RGD") ou um componente presente na matriz extracelular (ECM), tal como mono-, di- ou oligossacarídeos, ácido siálico, galactose, manose, fucose, ácido acetilneuramínico, peptídeos que contêm o motivo de sequência "RGD" etc.

[000116] As células-alvo incluem células que expressam um hormônio sexual ou esteroide gonadal ou um receptor de hormônio sexual ou de esteroide gonadal. As células-alvo incluem ainda células

que expressam um receptor que se liga a um hormônio de liberação de gonadotropina I, hormônio de liberação de gonadotropina II, hormônio de liberação de hormônio luteinizante III de lampreia, hormônio luteinizante, gonadotropina coriônica, hormônio estimulador de melanócitos, estradiol, dietilstilbesterol, dopamina, somatostatina, hormônio estimulador de folículos (FSH), glicocorticoide, estrogênio, testosterona, androstenodiona, di-hidrotestosterona, de-hidroepiandrosterona, progesterona, androgênio, fator de crescimento epidérmico (EGF), Her2/neu, vitamina H, ácido fólico ou um derivado do mesmo (por exemplo, folato), transferrina, hormônio estimulador da tireoide (TSH), endotelina, bombesina, Hormônio de Crescimento, peptídeo intestinal vasoativo, lactoferrina, uma integrina (por exemplo, integrina alfa-5 beta 3 ou alfa-5 beta 1), Fator de Crescimento de Nervos, CD19, CD20, CD23, CD27, CD28, CD30, CD33, CD40, CD52, CD56, CD70, CD154, receptores similares à imunoglobulina, ROR1, IGF-1, antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno específico da próstata (PSA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), Fator de Crescimento Transformador alfa, Fator de Crescimento Transformador beta, fator de crescimento similar à insulina, fator de crescimento endotelial vascular, insulina, ceruloplasmina ou HIV-tat.

[000117] As células-alvo incluem ainda células que expressam um receptor que se liga a um hormônio sexual ou esteroide gonadal ou um receptor de hormônio sexual ou de esteroide gonadal. As células-alvo incluem, além disso, células que expressam um receptor que se liga a um hormônio de liberação de gonadotropina I, hormônio de liberação de gonadotropina II, hormônio de liberação de hormônio luteinizante III de lampreia, cadeia beta do hormônio luteinizante, hormônio luteinizante, gonadotropina coriônica, subunidade beta da gonadotropina coriônica, hormônio estimulador de melanócitos, estradiol, dietilstilbesterol, dopamina, somatostatina, hormônio

estimulador de folículos (FSH), glicocorticoide, glicocorticoide, estrogênio, testosterona, androstenodiona, di-hidrotestosterona, de-hidroepiandrosterona, progesterona, androgênio, fator de crescimento epidérmico (EGF), Her2/neu, vitamina H, ácido fólico ou um derivado do mesmo (por exemplo, folato), transferrina, hormônio estimulador da tireoide (TSH), endotelina, bombesina, Hormônio de Crescimento, peptídeo intestinal vasoativo, lactoferrina, uma integrina (por exemplo, integrina alfa-5 beta 3 ou alfa-5 beta 1), Fator de Crescimento de Nervos, CD19, CD20, CD23, CD27, CD28, CD30, CD33, CD40, CD52, CD56, CD70, CD154, receptores similares à imunoglobulina, ROR1, IGF-1, antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno específico da próstata (PSA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), Fator de Crescimento Transformador alfa, Fator de Crescimento Transformador beta, insulina, ceruloplasmina, HIV-tat ou um análogo dos mesmos (por exemplo, mifepristone, flutaminde, lupron, xoladex, supprelin, synatel triptorelin, buserelin, centrorelix, ganirelix, abarelix, antide, teverelix ou degarelix (Fe200486)).

[000118] As células direcionadas para reduzir ou inibir a proliferação, de forma não seletiva ou de forma seletiva, incluem adicionalmente células que expressam "antígenos associados ao tumor", tais como antígeno carcinoembrionário (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno específico da próstata (PSA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), CA 125 (câncer de ovário epitelial residual), receptor de Interleucina-2 (IL-2) solúvel, RAGE-1, tirosinase, MAGE-1, MAGE-2, NY-ESO-1, Melan-A/MART-1, glicoproteína (gp) 75, gp100, beta-catenina, PRAME, MUM-1, ZFP161, Ubiquilina-1, HOX-B6, YB-1, Osteonectina e ILF3. As células direcionadas para reduzir ou inibir a proliferação, de forma não seletiva ou de forma seletiva, incluem ainda adicionalmente células que expressam transferrina, ácido fólico e derivados do mesmo (por exemplo, folato) e um membro da família de

fatores de necrose de tumor (TNF) ou, tais como TNF-alfa, TNF-beta (linfotóxina, LT), TRAIL, Fas, LIGHT e 41BB e receptores para os mesmos.

[000119] Os constructos de fusão e os métodos da invenção também podem ser aplicados para tratar a proliferação celular indesejável ou aberrante e distúrbios hiperproliferativos. Assim, de acordo com a invenção, são fornecidos métodos de tratamento de proliferação celular indesejável ou aberrante e distúrbios hiperproliferativos. Em uma modalidade, um método inclui a administração a um indivíduo (que necessita de tratamento) de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para tratar a proliferação celular indesejável ou aberrante ou o distúrbio hiperproliferativo.

[000120] O termo "distúrbio hiperproliferativo" refere-se a qualquer um de sobrevivência, crescimento ou proliferação celular indesejável ou aberrante (por exemplo, falha em sofrer morte celular programada ou apoptose). Tais distúrbios incluem hiperplasias benignas, neoplasias, cânceres, tumores e malignidades não metastáticos ou metastáticos. A proliferação celular indesejável ou aberrante e os distúrbios hiperproliferativos podem afetar qualquer célula, tecido, órgão em um indivíduo. A proliferação celular indesejável ou aberrante e os distúrbios hiperproliferativos podem estar presentes em um indivíduo, de forma local, regional ou sistêmica. Um distúrbio hiperproliferativo pode ser oriundo de um grande número de tecidos e órgãos, que incluem, mas não estão limitados a mama, pulmão (por exemplo, célula pequena ou célula que não é pequena), tireoide, cabeça e pescoço, cérebro, nasofaringe, garganta, nariz ou seios da face, linfóide, glândula adrenal, glândula pituitária, tireoide, linfa, gastrointestinal (boca, esôfago, estômago, duodeno, íleo, jejuno (intestino delgado), cólon, reto), trato genitourinário (útero, ovário, vagina, cérvice, endométrio, trompa de Falópio, bexiga, testículo, pênis,

próstata), rim, pâncreas, fígado, osso, medula óssea, linfa, sangue, músculo, pele e células tronco, que pode ou não sofrer metástase para outros sítios, regiões ou localizações secundárias.

[000121] Os constructos de fusão e os métodos da invenção também podem ser aplicados a tumor, câncer, malignidade ou neoplasia metastática ou não metastática de qualquer origem celular, de órgão ou de tecido. Tais distúrbios podem afetar virtualmente qualquer tipo de célula ou de tecido, por exemplo, carcinoma, sarcoma, melanoma, distúrbios neurais e reticuloendoteliais ou neoplásicos hematopoiéticos (por exemplo, mieloma, linfoma ou leucemia).

[000122] Como utilizado aqui, os termos "neoplasia" e "tumor" referem-se a uma célula ou uma população de células cujo crescimento, proliferação ou sobrevivência é maior que o crescimento, a proliferação ou a sobrevivência de uma célula correspondente normal, por exemplo, uma célula proliferativa ou um distúrbio de diferenciação. Um tumor é uma neoplasia que formou uma massa distinta ou um crescimento. Um "câncer" ou "malignidade" refere-se a uma neoplasia ou um tumor que pode invadir espaços, tecidos ou órgãos adjacentes. Uma "metástase" refere-se a uma neoplasia, um tumor, um câncer ou uma malignidade que se disseminou ou se espalhou partindo de seu sítio primário para um ou mais sítios, localizações ou regiões secundárias dentro do indivíduo, em que os sítios, as localizações ou as regiões são distintas daquelas do tumor ou do câncer primário.

[000123] Células neoplásicas, tumorais, cancerosas e malignas (metastáticas ou não metastáticas) incluem células neoplásicas, tumorais, cancerosas e malignas dormentes ou residuais. Tais células consistem tipicamente de células tumorais vestigiais que não estão se dividindo (interrupção em G0-G1). Estas células podem persistir em um sítio primário ou na forma de células neoplásicas, tumorais,

cancerosas ou malignas disseminadas na forma de uma doença residual mínima. Estas células neoplásicas, tumorais, cancerosas ou malignas dormentes permanecem assintomáticas, mas podem desenvolver sintomas graves e morte uma vez que estas células dormentes se proliferam. Os métodos da invenção podem ser utilizados para reduzir ou inibir a proliferação de células neoplásicas, tumorais, cancerosas ou malignas dormentes, que podem por sua vez inibir ou reduzir a reincidência do tumor ou do câncer ou a metástase ou a progressão do tumor ou do câncer.

[000124] De acordo com a invenção, são fornecidos os métodos de tratamento de um indivíduo que tem um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática. Em uma modalidade, um método inclui a administração a um indivíduo (que necessita de tratamento) de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para tratar (por exemplo, reduzir ou inibir a proliferação) o tumor, o câncer, a malignidade ou a neoplasia metastática ou não metastática.

[000125] O tumor, o câncer, a malignidade ou a neoplasia metastática ou não metastática pode estar em qualquer estágio, por exemplo, inicial ou avançado, tal como um tumor em estágio I, II, III, IV ou V. O tumor, o câncer, a malignidade ou a neoplasia metastática ou não metastática pode ter sido submetida a um tratamento prévio ou ser estabilizada (sem progressão) ou em remissão.

[000126] Em termos de metástase, os métodos da invenção podem ser utilizados para reduzir ou inibir a metástase de um tumor ou um câncer primário para outros locais ou a formação ou o estabelecimento de tumores ou cânceres metastáticos em outros locais distais daqueles do tumor ou do câncer primário inibindo ou reduzindo assim a reincidência do tumor ou do câncer ou a progressão do tumor ou do câncer. Assim, os métodos da invenção incluem, entre outras coisas,

1) a redução ou a inibição do crescimento, da proliferação, da mobilidade ou da capacidade de invasão de células tumorais ou cancerosas que potencialmente ou desenvolvem metástases (por exemplo, células tumorais disseminadas, DTC); 2) a redução ou a inibição da formação ou do estabelecimento de metástases que se originam partindo de um tumor ou um câncer primário em um ou mais outros locais, localizações ou regiões distintas daquelas do tumor ou câncer primário; 3) a redução ou a inibição do crescimento ou da proliferação de uma metástase em um ou mais outros locais, localizações ou regiões distintas daquelas do tumor ou câncer primário após uma metástase ter sido formada ou ter sido estabelecida; e 4) a redução ou a inibição da formação ou do estabelecimento de metástases adicionais após a metástase ter sido formada ou estabelecida.

[000127] As células de um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática podem ser agregadas em uma massa de células "sólida" ou estar dispersas ou difusas. Um tumor "sólido" refere-se a câncer, neoplasia ou metástase que tipicamente se agrega e forma uma massa. Os exemplos não limitantes específicos incluem tumores viscerais tais como melanomas, cânceres de mama, pancreáticos, uterinos e de ovário, câncer de testículo, que inclui seminomas, câncer gástrico ou de cólon, hepatomas, adrenal, carcinomas renais e de bexiga, cânceres pulmonares, de cabeça e pescoço e tumores/cânceres de cérebro.

[000128] Os carcinomas, que se referem a malignidades de tecido epitelial ou endócrino, incluem carcinomas do sistema respiratório, carcinomas do sistema gastrointestinal, carcinomas do sistema genitourinário, carcinomas de testículo, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas do sistema endócrino e melanomas. Os exemplos de carcinomas incluem aqueles que se

formam partindo do útero, da cérvix, do pulmão, da próstata, da mama, da cabeça e pescoço, do cólon, do pâncreas, dos testículos, da adrenal, do rim, do esôfago, do estômago, do fígado e do ovário. O termo inclui ainda carcinossarcomas, por exemplo, que incluem tumores malignos compostos de tecidos carcinomatosos e sarcomatosos. Adenocarcinoma inclui um carcinoma de um tecido glandular ou em que o tumor forma uma estrutura similar a uma glândula.

[000129] Os sarcomas referem-se a tumores malignos de origem de células mesenquimais. Os exemplos de sarcomas incluem, por exemplo, linfossarcoma, lipossarcoma, osteossarcoma, condrossarcoma, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma e fibrossarcoma.

[000130] As neoplasias neurais incluem glioma, glioblastoma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, astrocitoma e oligodendrocitoma.

[000131] Um "tumor líquido", que se refere à neoplasia que é de natureza dispersa ou difusa, uma vez que não forma tipicamente uma massa sólida. Os exemplos particulares incluem neoplasia do sistema reticuloendotelial ou hematopoiético, tal como linfomas, mielomas e leucemias. Os exemplos não limitantes de leucemias incluem linfoblásticas agudas e crônicas, mieloblásticas e mieloma múltiplo. Tipicamente, tais doenças surgem partindo de leucemias agudas fracamente diferenciadas, por exemplo, leucemia eritroblástica e leucemia megacarioblástica aguda. Os distúrbios mieloides específicos incluem, mas não estão limitados a, leucemia pró-mieloide aguda (APML), leucemia mielogenosa aguda (AML) e leucemia mielogenosa crônica (CML). As malignidades linfoides incluem, mas não estão limitadas a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), que inclui ALL de linhagem B e ALL de linhagem T, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia pró-linfocítica (PLL), leucemia de células peludas (HLL) e

macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Os linfomas malignos específicos incluem, linfoma sem ser de Hodgkin e variações, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T adultas (ATL), linfoma de células T cutâneas (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), doença de Hodgkin e doença de Reed-Sternberg.

[000132] Como descrito aqui, a proliferação celular indesejável ou aberrante ou os distúrbios hiperproliferativos podem ocorrer no útero, na mama, na vagina, na cérvix e na trompa de Falópio. A endometriose ocorre quando células do útero crescem fora do útero e em outras áreas, tais como ovários, bexiga ou intestino. Fibroides e pólipos podem afetar o útero, a mama, a vagina, a cérvix e a trompa de Falópio.

[000133] Assim, de acordo com a invenção, são fornecidos métodos de tratamento de endometriose e fibroides ou pólipos. Em uma modalidade, um método inclui a administração a um indivíduo de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para tratar a endometriose. Em outra modalidade, um método inclui a administração a um indivíduo de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para tratar um fibroide ou um pólipos.

[000134] As células-alvo incluem células que participam da ou são requeridas para a reprodução ou para a fertilidade. Assim, de acordo com a invenção, são fornecidos métodos de redução da fertilidade de um animal. Em uma modalidade, um método inclui a administração a um indivíduo de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para reduzir a fertilidade ou para reduzir a probabilidade de gravidez ou para reduzir a produção de espermatozoides em um mamífero do sexo masculino.

[000135] Como também descrito aqui, a proliferação celular indesejável ou aberrante ou os distúrbios hiperproliferativos podem ocorrer na próstata. Assim, de acordo com a invenção, são fornecidos

métodos de tratamento de hiperplasia benigna da próstata ou neoplasia metastática da próstata. Em uma modalidade, um método inclui a administração a um indivíduo de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para tratar a hiperplasia benigna da próstata ou a neoplasia metastática da próstata.

[000136] Qualquer composição, tratamento, protocolo, terapia ou regime que possui uma atividade ou um efeito antiproliferativo de células pode ser combinado com um constructo de fusão ou utilizado em combinação em um método da invenção. Os constructos de fusão e os métodos da invenção incluem, portanto, tratamentos, protocolos e terapias antiproliferativos, antitumor, anticâncer, antineoplásicos e antimetastáticos, que incluem qualquer outra composição, tratamento, protocolo ou regime terapêutico que inibe, diminui, retarda, atrasa, reduz ou previne um distúrbio hiperproliferativo, tal como crescimento, progressão, metástase, proliferação ou sobrevivência de tumor, câncer maligno ou neoplásico ou agravamento *in vitro* ou *in vivo*. Os exemplos não limitantes particulares de uma terapia antiproliferativa (por exemplo, tumor) incluem quimioterapia, imunoterapia, radioterapia (ionizante ou química), terapia térmica local (hipertermia), ressecção cirúrgica e vacinação. Um constructo de fusão pode ser administrado antes de, substancialmente de forma contemporânea a ou após a administração do tratamento ou da terapia antiproliferativa de células, antineoplásica, antitumor, anticâncer, antimetastática ou de aprimoramento do sistema imunológico. Um constructo de fusão pode ser administrado na forma de composições em combinação com o tratamento ou a terapia antiproliferativa de células, antineoplásica, antitumor, anticâncer, antimetastática ou de aprimoramento do sistema imunológico, tumor, câncer, malignidade ou neoplasia metastática ou não metastática.

[000137] As composições, as terapias, os protocolos ou os

tratamentos antiproliferativos, antineoplásicos, antitumor, anticâncer e antimetastáticos incluem aqueles que previnem, perturbam, interrompem, inibem ou retardam a progressão do ciclo celular ou a proliferação celular; estimulam ou aumentam a apoptose ou a morte celular inibem a síntese ou o metabolismo de ácidos nucleicos ou proteínas, inibem a divisão celular ou diminuem, reduzem ou inibem a sobrevivência celular ou a produção ou a utilização de um fator de sobrevivência, um fator de crescimento ou uma via de sinalização necessária (extracelular ou intracelular). Os exemplos não limitantes de classes de agentes químicos que possuem atividades antiproliferativas de células, antineoplásicas, antitumor, anticâncer e antimetastáticas incluem agentes alquilantes, antimetabólitos, extratos vegetais, alcaloides de plantas, nitrosouréias, hormônios, análogos de nucleosídeos e de nucleotídeos. Os exemplos específicos de fármacos que possuem atividades antiproliferativas de células, antineoplásicas, antitumor, anticâncer e antimetastáticas incluem ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina A, prednisolona, melfalan, clorambucil, mecloretamina, busulfan, metotrexato, 6-mercaptopurina, tioguanina, 5-fluorouracil, citosina arabinosídeo, AZT, 5-azacitidina (5-AZC) e compostos relacionados a 5-azacitidina tais como decitabina (5-aza-2'desoxicitidina), citarabina, 1-beta-D-arabinofuranosil-5-azacitosina e di-hidro-5-azacitidina, bleomicina, actinomicina D, mitramicina, mitomicina C, carmustina, lomustina, semustina, estreptozotocina, hidroxiuréia, cisplatina, mitotano, procarbazona, dacarbazina, taxol, vinblastina, vincristina, doxorubicina e dibromomanitol etc..

[000138] Os agentes adicionais que podem ser aplicados com os constructos de fusão e os métodos são conhecidos na técnicas e podem ser empregados. Por exemplo, agentes biológicos tais como anticorpos, fatores de crescimento celular, fatores de sobrevivência celular, fatores de diferenciação celular, citocinas e quimiocinas podem

ser administrados. Os exemplos não limitantes de anticorpos monoclonais incluem rituximab (Rituxan®), trastuzumab (Herceptin), bevacizumab (Avastin), cetuximab (Erbix), alemtuzumab (Campath), panitumumab (Vectibix), ibritumomab tiuxetan (Zevalin), tositumomab (Bexxar) etc. que podem ser utilizados em combinação com, *inter alia*, um constructo de fusão de acordo com a invenção. Outros fármacos direcionados que podem ser aplicados para uso com os constructos de fusão são imatinib (Gleevec), gefitinib (Iressa), bortezomib (Velcade), lapatinib (Tykerb), sunitinib (Sutent), sorafenib (Nexavar), nilotinib (Tasigna) etc. Os exemplos não limitantes de fatores de crescimento celular, fatores de sobrevivência celular, fatores de diferenciação celular, citocinas e quimiocinas incluem IL-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), IFN- γ , IL-12, TNF- α , TNF β , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, SDF-1, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxina, eotaxina-2, I-309/TCA3, ATAC, HCC-1, HCC-2, HCC-3, LARC/MIP-3 α , PARC, TARC, CK β , CK β 6, CK β 7, CK β 8, CK β 9, CK β 11, CK β 12, C10, IL-8, GRO α , GRO β , ENA-78, GCP-2, PBP/CTAP III β -TG/NAP-2, Mig, PBSF/SDF-1 e linfotactina.

[000139] Os exemplos não limitantes adicionais incluem tratamentos e terapias de aprimoramento do sistema imunológico, que incluem terapias baseadas em células. Em particular, os tratamentos e as terapias de aprimoramento do sistema imunológico incluem a administração de linfócitos, células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas, células NK e células B.

[000140] Os métodos de tratamento de um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática, os métodos de tratamento de um indivíduo que necessita de tratamento devido ao fato de ter ou estar em risco de ter um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática e os métodos de aumento da eficiência ou de melhora de uma terapia

antiproliferativa, antitumor, anticâncer, antineoplasia ou antimalignidade, são fornecidos. Nas modalidades respectivas, um método inclui a administração a um indivíduo com ou em risco de um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática, de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para tratar o tumor, o câncer, a malignidade ou a neoplasia metastática ou não metastática; a administração ao indivíduo de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para tratar o indivíduo; e a administração a um indivíduo que está passando por ou passou por uma terapia para tumor, câncer, malignidade ou neoplasia metastática ou não metastática, de uma quantidade de um constructo de fusão suficiente para aumentar a eficiência da terapia antiproliferativa, antitumor, anticâncer, antineoplasia ou antimalignidade.

[000141] Os métodos da invenção podem ser praticados antes de (isto é, profilaxia), de forma concorrente a ou após a evidência da presença de proliferação celular indesejável ou aberrante ou um distúrbio hiperproliferativo, doença ou condição benigna (por exemplo, um ou mais sintomas). A administração de um constructo de fusão antes de, formar concorrente a ou imediatamente após o desenvolvimento de um sintoma de proliferação celular indesejável ou aberrante ou um distúrbio hiperproliferativo pode diminuir a ocorrência, a frequência, a gravidade, a progressão ou a duração de um ou mais sintomas da proliferação celular indesejável ou aberrante ou um distúrbio hiperproliferativo, doença ou estado de saúde no indivíduo. Em adição, a administração de um constructo de fusão antes de, de forma concorrente a ou imediatamente após o desenvolvimento de um ou mais sintomas da proliferação celular indesejável ou aberrante ou um distúrbio hiperproliferativo, doença ou estado de saúde pode inibir, diminuir ou prevenir o espalhamento ou a disseminação de células hiperproliferativas (por exemplo, metástase) para outros locais,

regiões, tecidos ou órgãos em um indivíduo ou o estabelecimento de células hiperproliferativas (por exemplo, metástase) em outros sítios, regiões, tecidos ou órgãos em um indivíduo.

[000142] Os constructos de fusão e os métodos da invenção, tais como métodos de tratamento podem fornecer um benefício ou uma melhora terapêutica detectável ou mensurável a um indivíduo. Um benefício ou uma melhora terapêutica é qualquer benefício mensurável ou detectável, objetivo ou subjetivo, transitório, temporário ou de longo prazo ao indivíduo ou uma melhora no estado de saúde, distúrbio ou doença, um sintoma adverso, consequência ou causa subjacente, de qualquer grau, em um tecido, órgão, célula ou população de células do indivíduo. Os benefícios e as melhoras terapêuticas incluem, mas não estão limitados à redução ou diminuição da ocorrência, frequência, gravidade, progressão ou duração de um ou mais sintomas ou complicações associadas a um distúrbio, doença ou estado de saúde ou uma causa subjacente ou efeito consequente do distúrbio, da doença ou do estado de saúde. Os constructos de fusão e os métodos da invenção incluem, portanto, o fornecimento de um benefício ou uma melhora terapêutica a um indivíduo.

[000143] Em um método da invenção em que um benefício ou uma melhora terapêutica é um resultado desejado, um constructo de fusão da invenção pode ser administrada em uma quantidade suficiente ou eficiente a um indivíduo que necessita da mesma. Uma "quantidade suficiente" ou "quantidade eficiente" refere-se a uma quantidade que fornece, em doses únicas ou múltiplas, isoladamente ou em combinação, com uma ou mais outras composições (agentes terapêuticos tais como um fármaco quimioterapêutico ou estimulador do sistema imunológico), tratamentos, protocolos ou agentes para regimes terapêuticos, uma resposta detectável de qualquer duração de tempo (longo ou curto prazo), um resultado desejado em ou um

benefício para um indivíduo de qualquer grau mensurável ou detectável ou ao longo de qualquer duração de tempo (por exemplo, durante horas, dias, meses, anos ou cura). As doses ou "quantidade suficiente" ou "quantidade eficiente" para tratamento (por exemplo, para fornecer um benefício ou uma melhora terapêutica) tipicamente é eficiente para melhorar um distúrbio, uma doença ou um estado de saúde ou um, vários ou todos os sintomas adversos, as consequências ou as complicações do distúrbio, da doença ou do estado de saúde, até uma extensão mensurável, embora a redução ou a inibição da progressão ou o agravamento do distúrbio, da doença ou do estado de saúde ou um sintoma, é considerada um resultado satisfatório.

[000144] O termo "melhorar" significa uma melhora objetiva ou subjetiva detectável no estado de saúde de um indivíduo. Uma melhora detectável inclui uma redução subjetiva ou objetiva na ocorrência, na frequência, na gravidade, na progressão ou na duração de um sintoma causado por ou associado a um distúrbio, uma doença ou um estado de saúde, uma melhora em uma causa subjacente ou uma consequência do distúrbio, da doença ou do estado de saúde ou uma reversão do distúrbio, da doença ou do estado de saúde.

[000145] O tratamento pode, portanto, resultar na inibição, na redução ou na prevenção de um distúrbio, uma doença ou um estado de saúde ou um sintoma ou uma consequência ou uma causa subjacente associada; inibição, redução ou prevenção de uma progressão ou um agravamento de um distúrbio, uma doença, um estado de saúde, um sintoma ou uma consequência ou uma causa subjacente; ou deterioração ou ocorrência adicional de um ou mais sintomas adicionais do distúrbio, da doença, do estado de saúde ou do sintoma. Assim, um resultado de tratamento bem sucedido leva a um "efeito terapêutico" ou "benefício" ou inibição, redução ou prevenção

da ocorrência, da frequência, da gravidade, da progressão ou da duração de um ou mais sintomas ou causas subjacentes ou consequências de um estado de saúde, um distúrbio, uma doença ou um sintoma no indivíduo. Os métodos de tratamento que afetam uma ou mais causas subjacentes do estado de saúde, do distúrbio, da doença ou do sintoma são, portanto, considerados como sendo benéficos. A estabilização ou a inibição da progressão ou do agravamento de um distúrbio ou um estado de saúde é também um resultado de tratamento bem sucedido.

[000146] Um benefício ou uma melhora terapêutica, portanto, não precisa ser a ablação de qualquer um, da maior parte ou de todos os sintomas, as complicações, as consequências ou as causas subjacentes associadas com o estado de saúde, o distúrbio ou a doença. Assim, uma meta satisfatória é atingida quando há um aprimoramento com incremento no estado de saúde de um indivíduo ou uma redução parcial na ocorrência, na frequência, na gravidade, na progressão ou na duração ou inibição ou reversão, de um ou mais sintomas adversos ou complicações ou consequências associadas ou causas subjacentes, agravamento ou progressão (por exemplo, estabilização de um ou mais sintomas ou complicações do estado de saúde, do distúrbio ou da doença), de uma ou mais das manifestações fisiológicas, bioquímicas ou celulares ou características do distúrbio ou doença, ao longo de um período de tempo curto ou longo (horas, dias, semanas, meses etc.).

[000147] Em modalidades particulares, um método de tratamento resulta na destruição parcial ou completa de uma massa de células, um volume, um tamanho ou números de células malignas ou neoplásicas tumorais, cancerosas metastáticas ou não metastáticas; resulta na estimulação, na indução ou no aumento de necrose, lise ou apoptose células malignas ou neoplásicas tumorais, cancerosas

metastáticas ou não metastáticas; resulta na redução de volume, tamanho, massa de células malignas ou neoplásicas tumorais, cancerosas metastáticas ou não metastáticas; resulta na inibição ou na prevenção da progressão ou de um aumento no volume, na massa, no tamanho ou nos números de células malignas ou neoplásicas tumorais, cancerosas metastáticas ou não metastáticas; resulta na inibição ou na diminuição do espalhamento ou da disseminação de células hiperproliferativas (por exemplo, metástase) para outros sítios (secundários), regiões, tecidos ou órgãos em um indivíduo ou do estabelecimento de células hiperproliferativas (por exemplo, metástase) em outros sítios (secundários), regiões, tecidos ou órgãos em um indivíduo; ou resulta no prolongamento do tempo de vida do indivíduo. Em modalidades particulares adicionais, um método de tratamento resulta na redução ou na diminuição da gravidade, da duração ou da frequência de um sintoma adverso ou complicação associada com ou causada pelo tumor, pelo câncer, pela malignidade ou pela neoplasia metastática ou não metastática.

[000148] Uma quantidade suficiente ou uma quantidade eficiente pode, mas não precisa ser fornecida em uma única administração e, pode, mas não precisa ser administrada isoladamente ou em combinação com outra composição (por exemplo, agente quimioterapêutico ou intensificador ou estimulador do sistema imunológico), tratamento, protocolo ou regime terapêutico. Por exemplo, a quantidade pode ser aumentada de forma proporcional que é indicada pela necessidade do indivíduo, pela condição do distúrbio, da doença ou do estado de saúde tratado ou pelos efeitos colaterais do tratamento. Em adição, uma quantidade suficiente ou uma quantidade eficiente não precisa ser suficiente ou eficiente se fornecida em doses únicas ou múltiplas sem uma segunda composição (por exemplo, agente quimioterapêutico ou estimulador do

sistema imunológico), tratamento, protocolo ou regime terapêutico, uma vez que doses, quantidades ou duração adicional acima e abaixo de tais doses ou composições adicionais (por exemplo, agentes quimioterapêuticos ou estimuladores do sistema imunológico), tratamentos, protocolos ou regime terapêuticos podem ser incluídas com a finalidade de serem consideradas eficientes ou suficientes em um certo indivíduo. As quantidades consideradas suficientes incluem ainda quantidades que resultam em uma redução do uso de outro tratamento, regime terapêutico ou protocolo.

[000149] Uma quantidade suficiente ou uma quantidade eficiente não precisa ser eficiente em cada e todo indivíduo tratado, de forma profilática ou terapêutica, nem em uma maioria dos indivíduos tratados em certo grupo ou população. Como é típico para os métodos de tratamento ou terapêuticos, alguns indivíduos exibirão maior ou menor resposta a certo tratamento, regime terapêutico ou protocolo. Uma quantidade suficiente ou uma quantidade eficiente refere-se à suficiência ou eficiência em um indivíduo particular, não em um grupo ou na população geral. Tais quantidades dependerão em parte do estado de saúde tratado, tal como o tipo ou o estágio de proliferação celular indesejável ou aberrante ou distúrbio hiperproliferativo (por exemplo, um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática), do efeito terapêutico desejado, bem como do próprio indivíduo (por exemplo, a disponibilidade biológica dentro do indivíduo, gênero, idade etc.).

[000150] Os exemplos não limitantes particulares de benefício ou melhora terapêutica para proliferação celular indesejável ou aberrante, tal como um distúrbio hiperproliferativo (por exemplo, um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática) incluem uma redução no tamanho, na massa ou no volume de células, uma inibição de um aumento no tamanho, na

massa ou no volume de células, um retardo ou uma inibição do agravamento ou da progressão, estimulação de necrose, lise ou apoptose celular, uma redução ou uma inibição da malignidade ou tumor neoplásico ou metástase, redução da mortalidade e prolongamento do tempo de vida de um indivíduo. Assim, a inibição ou o retardo de um aumento no tamanho, massa, volume ou metástase celular (estabilização) pode aumentar o tempo de vida (reduzir a mortalidade) mesmo se apenas durante alguns dias, semanas ou meses, muito embora a ablação completa do tumor, do câncer, da malignidade ou da neoplasia metastática ou não metastática não tenha ocorrido. Os sintomas adversos e as complicações associados com um distúrbio hiperproliferativo (por exemplo, um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática) que podem ser reduzidas ou diminuídas incluem, por exemplo, dor, náusea, desconforto, falta de apetite, letargia e fraqueza. Uma redução na ocorrência, frequência, gravidade, progressão ou duração de um sintoma de proliferação celular indesejável ou aberrante, tal como um distúrbio hiperproliferativo (por exemplo, um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática), tal como uma melhora na sensação subjetiva (por exemplo, maior energia, apetite, náusea reduzida, melhor mobilidade ou bem estar psicológico etc.), são, portanto, todos exemplos de benefício ou melhora terapêutica.

[000151] Por exemplo, uma quantidade suficiente ou eficiente de um constructo de fusão é considerada como possuindo um efeito terapêutico se a administração resultar em menos fármaco quimioterapêutico, radiação ou imunoterapia que é necessária para o tratamento de proliferação celular indesejável ou aberrante, tal como um distúrbio hiperproliferativo (por exemplo, um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática).

[000152] O termo "indivíduo" refere-se a animais, tipicamente animais mamíferos, tais como seres humanos, primatas não humanos (símios, gibão, chimpanzés, orangotango, macacos), animais domésticos (cães e gatos), animais de fazenda (equinos, bovinos, caprinos, ovinos, suínos) e animal experimental (camundongo, rato, coelho, porquinho da Índia). Os indivíduos incluem modelos de doenças de animais, por exemplo, modelos de animais de proliferação celular indesejável ou aberrante, tal como um distúrbio hiperproliferativo (por exemplo, um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática) para análise de constructos de fusão *in vivo*.

[000153] Os indivíduos apropriados para tratamento incluem aqueles que possuem ou estão em risco de ter uma célula tumoral, cancerosa, maligna ou neoplásica metastática ou não metastática, que estão passando por, bem como aqueles que não estão passando ou que passaram por terapia antiproliferativa (por exemplo, tumor, câncer, malignidade ou neoplasia metastática ou não metastática), que inclui indivíduos em que o tumor está em remissão. Os indivíduos "em risco" tipicamente possuem fatores de risco associados com a proliferação celular indesejável ou aberrante, o desenvolvimento de hiperplasia (por exemplo, um tumor).

[000154] Os exemplos particulares de indivíduos em risco ou candidatos incluem aqueles com células que expressam um receptor, um ligante, um antígeno ou um anticorpo ao qual um constructo de fusão pode se ligar, particularmente quando células direcionadas para necrose, lise, morte ou destruição expressam maiores números ou quantidades de receptor, ligante, antígeno ou anticorpo que as células que não são -alvos. Tais células podem ser direcionadas de forma seletiva ou preferencialmente para necrose, lise ou morte.

[000155] Os indivíduos em risco incluem ainda aqueles que são

candidatos para e aqueles que sofreram resseção cirúrgica, quimioterapia, imunoterapia, radioterapia ionizante ou química, terapia ou vacinação térmica local ou regional (hipertermia). A invenção é, portanto, aplicável para o tratamento de um indivíduo que está em risco de um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática ou uma complicação associada com um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática, por exemplo, devido ao reaparecimento ou a um novo crescimento do tumor, do câncer, da malignidade ou da neoplasia metastática ou não metastática após um período de estabilidade ou de remissão.

[000156] Os fatores de risco incluem gênero, estilo de vida (dieta, tabagismo), ocupação (pessoal médico e clínico, trabalhadores na agricultura e com gado), fatores ambientais (exposição a agentes carcinogênicos), histórico familiar (distúrbios autoimunes, diabetes etc.), pré-disposição genética etc. Por exemplo, os indivíduos em risco de desenvolver melanoma incluem exposição ao sol em excesso (radiação ultravioleta), pele clara, altos números de nevus (nevus displásico), fenótipo do paciente, histórico familiar ou um histórico de um melanoma anterior. Os indivíduos em risco de desenvolver câncer podem, portanto, ser identificados pelo estilo de vida, ocupação, fatores ambientais, histórico familiar e verificações genéticas para genes associados a tumores, deleções gênicas ou mutações gênicas. Os indivíduos em risco de desenvolver câncer de mama não possuem *Brca1*, por exemplo. Os indivíduos em risco de desenvolver câncer de cólon possuem formação de pólipos precoce ou em alta frequência ou genes supressores de tumor deletados ou mutados, tal como cólon poliposo adematoso (*APC*), por exemplo.

[000157] Os indivíduos incluem ainda aqueles impossibilitados de outros tratamentos. Por exemplo, certos indivíduos podem não ser

bons candidatos para resseção cirúrgica, quimioterapia, imunoterapia, radioterapia ionizante ou química, terapia ou vacinação térmica local ou regional (hipertermia). Assim, os indivíduos candidatos para tratamento de acordo com a invenção incluem aqueles que não são um candidato para resseção cirúrgica, quimioterapia, imunoterapia, radioterapia ionizante ou química, terapia ou vacinação térmica local ou regional (hipertermia).

[000158] Os constructos de fusão podem ser formulados em uma dose unitária ou em uma forma de dosagem unitária. Em uma modalidade particular, um constructo de fusão está em uma quantidade eficiente para tratar um indivíduo que tem proliferação celular indesejável ou aberrante ou um distúrbio hiperproliferativo. Em uma modalidade particular adicional, um constructo de fusão está em uma quantidade eficiente para tratar um indivíduo que tem um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática. Em uma modalidade particular adicional, um constructo de fusão está em uma quantidade eficiente para reduzir a fertilidade de um indivíduo. Os exemplos de doses unitárias variam de aproximadamente 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 ou 2500-5000, 5000-25.000, 5000-50.000 ng; e de aproximadamente 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 ou 2500-5000, 5000-25.000, 5000-50.000 µg.

[000159] As composições e os métodos da invenção podem ser colocados em contato ou fornecidos *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. As composições podem ser administradas para fornecer o efeito pretendido na forma de dosagens únicas ou múltiplas, por exemplo, em uma quantidade eficiente ou suficiente. Os exemplos de doses variam de aproximadamente 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 ou 2500-5000, 5000-25.000, 5000-50.000 pg/kg; de aproximadamente 50-500, 500-5000, 5000-25.000 ou 25.000-50.000 ng/kg; e de

aproximadamente 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 ou 2500-5000, 5000-25.000, 5000-50.000 µg/kg, em dias consecutivos ou alternados ou de forma intermitente. As doses únicas ou múltiplas podem ser administradas em dias consecutivos, dias alternados ou de forma intermitente.

[000160] As composições podem ser administradas e os métodos podem ser praticados através de administração sistêmica, regional ou local, através de qualquer via. Por exemplo, um constructo de fusão pode ser administrado de forma sistêmica, de forma regional, de forma intravenosa ou de forma oral (por exemplo, ingestão ou inalação), de forma intramuscular, de forma intraperitoneal, de forma intradermal, de forma subcutânea, intracavidade, intracraniana, transdermal (tópica), de forma parenteral, por exemplo, transmucosa ou de forma retal. As composições e os métodos da invenção que incluem formulações farmacêuticas podem ser administrados através de um sistema de fornecimento (micro)encapsulado ou empacotados dentro de um implante para administração.

[000161] A invenção fornece ainda constructos de fusão e métodos em que os constructos de fusão são incluídos em composições farmacêuticas. Uma composição farmacêutica refere-se a veículos, diluentes ou excipientes "farmaceuticamente aceitáveis" e "fisiologicamente aceitáveis". Como utilizado aqui, os termos "farmaceuticamente aceitáveis" e "fisiologicamente aceitáveis", quando se referem a veículos, diluentes ou excipientes incluem solventes (aquosos ou não aquosos), detergentes, soluções, emulsões, meios de dispersão, revestimentos, agentes isotônicos e promotores e retardantes da absorção, compatíveis com a administração farmacêutica e com os outros componentes da formulação. Tais formulações podem estar contidas em um comprimido (revestido ou não revestido), uma cápsula (dura ou macia), uma microesfera, uma

emulsão, um pó, um grânulo, um cristal, uma suspensão, um xarope ou um elixir.

[000162] As composições farmacêuticas podem ser formuladas para serem compatíveis com uma via particular de administração. As composições para administração parenteral, intradermal ou subcutânea podem incluir um diluente esterilizado, tal como água, solução salina, óleos fixados, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos. A preparação pode conter um ou mais conservantes para prevenir o crescimento de micro-organismos (por exemplo, agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfeto de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminatetraacético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade tais como cloreto de sódio ou dextrose).

[000163] As composições farmacêuticas para injeção incluem soluções aquosas esterilizadas (quando solúveis em água) ou dispersões e pós esterilizados para a preparação extemporânea de soluções injetáveis esterilizadas ou dispersão. Para a administração intravenosa, os veículos adequados incluem solução salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) ou solução salina tamponada com fosfato (PBS). O veículo pode ser um solvente ou um meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez pode ser mantida, por exemplo, através do uso de um revestimento tal como lecitina ou através do uso de tensoativos. Os agentes antibacterianos e antifúngicos incluem, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico e timerosal. A inclusão de um agente que retarda a absorção, por exemplo, monostearato de alumínio e gelatina pode prolongar a absorção de composições injetáveis.

[000164] As formulações farmacêuticas adicionais e os sistemas de fornecimento são conhecidos na técnica e são aplicáveis nos métodos da invenção (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12^a ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993); e Poznansky e outros, Drug Delivery Systems, R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y. (1980), pp. 253-315).

[000165] A invenção fornece kits que incluem constructos de fusão da invenção, composições de combinação e formulações farmacêuticas das mesmas, embalados em material de embalagem adequado. Um kit inclui opcionalmente um rótulo ou um encarte da embalagem que inclui uma descrição dos componentes ou as instruções para uso *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*, dos componentes contidos ali. Os exemplos de instruções incluem instruções para reduzir ou inibir a proliferação de uma célula, reduzir ou inibir a proliferação de células indesejáveis ou aberrantes, tais como uma célula hiperproliferativa, reduzir ou inibir a proliferação de uma célula tumoral, cancerosa, maligna ou neoplásica metastática ou não metastática, tratar um indivíduo que tem um distúrbio hiperproliferativo, tratar um indivíduo que tem um tumor, um câncer, uma malignidade ou uma neoplasia metastática ou não metastática ou reduzir a fertilidade de um animal.

[000166] Um kit pode conter uma coleção de tais componentes, por exemplo, dois ou mais constructos de fusão isoladamente ou em combinação com outra composição terapeuticamente útil (por exemplo, um fármaco antiproliferativo ou de aprimoramento do sistema imunológico).

[000167] O termo "material de embalagem" refere-se a uma estrutura

física que abriga os componentes do kit. O material de embalagem pode manter os componentes de forma esterilizada e pode ser feito de material comumente utilizado para tais finalidades (por exemplo, papel, fibra corrugada, vidro, plástico, folha de alumínio, ampolas, frascos, tubos etc.).

[000168] Os kits da invenção podem incluir rótulos ou encartes. Os rótulos ou os encartes incluem a "matéria impressa", por exemplo, papel ou cartolina ou podem estar separados ou afixados a um componente, um kit ou um material de embalagem (por exemplo, uma caixa) ou anexados a uma ampola, um tubo ou um frasco contendo um componente do kit. Os rótulos ou os encartes podem incluir adicionalmente um meio que pode ser lido pelo computador, tal como um disco (por exemplo, um disquete, um disco rígido, um ZIP disk), um disco óptico tal como CD- ou DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, fita magnética ou um meio de armazenamento elétrico tal como RAM e ROM ou híbridos destes tais como meios de armazenamento magnético/óptico, meios FLASH ou cartões do tipo memória.

[000169] Os rótulos ou os encartes podem incluir a informação de identificação de um ou mais componentes contidos ali, quantidades de doses, farmacologia clínica do(s) ingrediente(s) ativo(s) incluindo o mecanismo de ação, a farmacocinética e a farmacodinâmica. Os rótulos ou os encartes podem incluir a informação que identifica a informação do fabricante, os números de lote, a localização do fabricante e a data.

[000170] Os rótulos ou os encartes podem incluir informação sobre um estado de saúde, um distúrbio, uma doença ou um sintoma para o qual um componente do kit pode ser utilizado. Os rótulos ou os encartes podem incluir instruções para o médico ou para um indivíduo para a utilização de um ou mais dos componentes do kit em um método, protocolo de tratamento ou regime terapêutico. As instruções

podem incluir quantidades, frequência ou duração de dosagem e instruções para a prática de qualquer um dos métodos, protocolos de tratamento ou regimes terapêuticos apresentados aqui. Os exemplos de instruções incluem, instruções para o tratamento de uma proliferação celular indesejável ou aberrante, células hiperproliferativas e distúrbios (por exemplo, tumor, câncer, malignidade ou neoplasia metastática ou não metastática). Os kits da invenção podem incluir, portanto, adicionalmente rótulos ou instruções para a prática de qualquer um dos métodos da invenção descritos aqui incluindo os métodos de tratamento.

[000171] Os rótulos ou os encartes podem incluir informação sobre qualquer benefício que um componente pode fornecer, tal como um benefício profilático ou terapêutico. Os rótulos ou os encartes podem incluir informação sobre os efeitos colaterais adversos potenciais, tal como advertências para o indivíduo ou o médico em relação a situações em que não seria apropriado utilizar uma composição particular. Os efeitos colaterais adversos também poderiam ocorrer quando o indivíduo tomou, tomará ou está atualmente tomando uma ou mais outras medicações que podem ser incompatíveis com composição ou o indivíduo sofreu, sofrerá ou está atualmente sofrendo outro protocolo de tratamento ou regime terapêutico que seria incompatível com a composição e, portanto, as instruções poderiam incluir informação em relação a tais incompatibilidades.

[000172] Os kits da invenção podem incluir adicionalmente outros componentes. Cada componente do kit pode estar inserido dentro de um recipiente individual e todos os vários recipientes podem estar dentro de uma única embalagem. Os kits da invenção podem ser planejados para armazenamento a frio. Os kits da invenção podem ainda ser planejados para conterem células hospedeiras que expressam os constructos de fusão da invenção ou que contêm ácidos

nucleicos que codificam os constructos de fusão. As células no kit podem ser mantidas sob condições de armazenamento apropriadas até que as células estejam prontas para serem utilizadas. Por exemplo, um kit que inclui uma ou mais células pode conter um meio de armazenamento das células apropriado de forma que as células possam ser descongeladas e crescidas.

[000173] A não ser que seja definido de outra maneira, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui possuem o mesmo significado que o comumente entendido por um versado na técnica à qual esta invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos aqui possam ser utilizados na prática ou no teste da presente invenção, métodos e materiais adequados são descritos aqui.

[000174] Todos os pedidos de patentes, as publicações, as patentes e outras referências, menções do GenBank e menções da ATCC citados aqui são incorporados como referência em sua totalidade. No caso de conflito, o relatório descritivo, que inclui as definições, fará o controle.

[000175] Como utilizado aqui, as formas no singular "um(a)", "e" e "o(a)" incluem os referentes no plural a não ser que o contexto indique claramente de outra maneira. Assim, por exemplo, a referência a "um constructo de fusão" ou um "domínio lítico" inclui um grande número de tais constructos de fusão ou domínios líticos etc.

[000176] Como utilizado aqui, todos os valores numéricos ou faixas numéricas incluem números inteiros dentro de tais faixas e frações dos valores ou dos números inteiros dentro das faixas a não ser que o contexto indique claramente de outra maneira. Assim, por exemplo, a referência a uma faixa de 90-100%, inclui 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97% etc., bem como 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5% etc., 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5% etc. e assim por diante.

[000177] A invenção é geralmente descrita aqui utilizando linguagem afirmativa para descrever as várias modalidades. A invenção inclui ainda especificamente modalidades em que o assunto particular é excluído, completamente ou em parte, tais como substâncias ou materiais, etapas de método e condições, protocolos, procedimentos, ensaios ou análise. Assim, muito embora a invenção não seja geralmente expressa aqui em termos do que a invenção não inclui, entretanto, os aspectos que não são expressamente incluídos na invenção são descritos aqui.

[000178] Um número de modalidades da invenção foi descrito. Todavia, será entendido que várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e do âmbito da invenção. Consequentemente, é pretendido que os exemplos a seguir ilustrem, mas não limitem o âmbito da invenção descrito nas reivindicações.

Exemplos

Exemplo 1

[000179] Estudos iniciais incluíam a verificação *in vitro* de 28 peptídeos de domínio lítico que continham sequências de dobradiça diferentes entre a porção do peptídeo lítico e ligantes; que continham 30% de D aminoácidos (D-enanciômeros), que tinham 18 e 15 aminoácidos de comprimento para a porção do peptídeo lítico e continham sequência de dobradiça ou seus D-enanciômeros. A introdução de ácido α -aminocaproico como um espaçador nos análogos de Phor21 21, 18 e 15 aminoácidos foi estudada. Os ligantes escolhidos para estudo incluíam β CG-ala, um fragmento da porção de ligação de 15 aminoácidos da cadeia beta da gonadotropina coriônica e LHRH, um decapeptídeo que representa um ligante funcional completo.

Exemplo 2

[000180] Este exemplo descreve a verificação em relação à

toxicidade celular (IC50) e à atividade hemolítica utilizando uma linhagem de células de câncer de mama humano.

[000181] Dezoito constructos de fusão conjugadas β CG-ala e oito LHRH foram estudados e comparados a Phor21- β CG-ala e peptídeos Phor21 e Phor18 (338913) = CLIP71 conjugados. A linhagem de células de câncer de mama humano MDA-MB-435S.luc, que superexpressa gonadotropina coriônica (CG) e receptores do hormônio de liberação do hormônio luteinizante (LHRH), foi utilizada para verificação nos números de passagens 248-252. A linhagem de células MDA-MB-435S.luc foi construída partindo da linhagem de células MDA-MB-435S obtida na American Type Cell Culture Collection através da transfecção estável com o plasmídeo PRC/CMV-luc contendo o gene da luciferase de *Photinus pyralis* e um gene de resistência ao anticorpo por lipofecção. A linhagem de células transfectada de forma estável foi selecionada utilizando G418 e os clones com a expressão mais alta para o gene da luciferase foram testados em relação a sua expressão do LH e do receptor de LHRH.

[000182] As células MDA-MB-435S.luc foram crescidas em meio de Leibovitz L 15, 10% de soro fetal bovino, 0,01 mg/mL de insulina bovina, 100 IU/mL de penicilina, 100 microg/mL de estreptomicina. As células foram cultivadas em frascos fechados firmemente. As incubações foram realizadas utilizando placas de 96 poços a 10.000 células por poço. As células eram tipicamente semeadas em placas de 96 poços e o meio foi substituído após 48 horas de incubação. Cada ensaio foi realizado em concentrações crescentes de doses de 0, 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 100 micromolares de conjugado de peptídeo lítico-domínio de ligação. Cada conjugado de peptídeo lítico-domínio de ligação foi fornecido na forma liofilizada e foi dissolvido na hora em solução salina e adicionado nas células. A duração de incubação era tipicamente de 24 h e os ensaios de

viabilidade celular foram realizados utilizando ensaios de conversão de formazan (ensaio MTT). Os controles continham solução salina ou 0,1% de triton como referência para 0 e 100% de morte celular, respectivamente.

[000183] Os dados foram processados e analisados utilizando o software Graph Pad Prism 4™ (Graph Pad Prism, Inc). A análise estatística para significância foi determinada por um teste T de Student de duas extremidades. Cada estudo foi realizado para atingir um N de pelo menos 8.

[000184] O efeito de aumentar o comprimento do constructo de fusão foi determinado (Javadpour e outros, *J Med Chem* 39:3107 (1996); Javadpour e Barkeley, *Biochemistry* 36:9540 (1997); Leuschner e Hansel, *Current Pharmaceutical Design*, 10:2299 (2004); e Leuschner e Hansel, *Biol Reprod* 73:255 (2005)). Os peptídeos líticos conjugados no terminal C com β CG-ala exibiram maior toxicidade com o aumento do comprimento do constructo. A IC₅₀ para os peptídeos de vários comprimentos era: (Phor 14) de 14 aminoácidos 5,74, (Phor15) de 15 aminoácidos 1,92, (Phor18 = CLIP71) de 18 aminoácidos 1,09, (Phor21) de 21 aminoácidos 2,31 e (Phor28) de 28 aminoácidos 1,36 μ M (**Tabela 3**).

[000185] O efeito da posição da porção de ligação (terminal N ou C) foi determinado. Sucintamente, foram estudados os constructos de fusão Phor21- β CG-ala (terminal C), β CG-ala Phor21 (terminal N), LHRH-Phor21 (terminal N) e Phor21-LHRH (terminal C). A IC₅₀ dos peptídeos era: Phor21- β CG-ala 2,3 μ M, para β CG-ala-Phor21 4,7 μ M, para LHRH-Phor21 2,65 μ M e para Phor21-LHRH 1,71 μ M. Os dados demonstram que o posicionamento C-terminal de porções de ligação β CG-ala e LHRH exibiam maior toxicidade que se a porção de ligação fosse posicionada no terminal N.

[000186] O receptor de LHRH está presente em muitos cânceres

humanos (ver a **Tabela 1**). A atividade de LHRH como a porção de ligação foi comparada com β CG-ala como a porção de ligação.

[000187] As toxicidades de LHRH-Phor21 e Phor21- β CG-ala foram comparadas em células de câncer de mama humano MDA-MB-435S.luc *in vitro*, em 2 ou 24 horas de incubação. Os dados indicam que LHRH-Phor21 matava as células mais rapidamente que Phor21- β CG-ala, LHRH-Phor21 induzindo morte celular dentro 2 horas (Figura 1).

Tabela 1: Receptores de LH e LHRH em Cânceres Humanos

Tipo de Câncer	Receptores de LH	Receptores de LHRH
Mama	72%	52%
Próstata	100%	86%
Ovário	40%	80%
Endometrial	17%	80%
Pancreático	N.D.	68%
Pulmonar	Sim	N.D.
Melanoma	68%	Sim
Cerebral	N.D.	Sim
Cólon	N.D.	Sim
Oral	N.D.	Sim

[000188] A introdução de sequências de dobradiça, espaçadoras ou ligantes entre o domínio lítico e a porção de ligação resultou em peptídeos com maior potência que Phor21- β CG-ala na morte celular. (Figura 2, **Tabela 2**). Enquanto a introdução de sequências de dobradiça ou espaçadoras no constructo de fusão Phor21- β CG-ala não alterava a atividade de matar células significativamente, o efeito de ASAAS como uma sequência de dobradiça aumentava significativamente a toxicidade de peptídeos líticos com 15 aminoácidos para o conjugado com β CG; este efeito estava ausente no caso dos peptídeos conjugados com β CG e LHRH Phor18-LHRH e Phor18-ASAAS-LHRH, que eram igualmente eficientes *in vitro* (**Tabela**

2, Figura 4). Um efeito similar foi observado quando a sequência de dobradiça foi substituída por um espaçador de 6 carbonos, ácido alfa amino caproico (**Tabela 2**). A substituição de alanina por glicina na segunda sequência de dobradiça (GSGGS) resultou em uma atividade significativamente menor, sugerindo que a glicina pode ter tido um efeito de desestabilização da hélice. (Figura 2, **Tabela 2**).

Tabela 2: Efeito do comprimento do peptídeo de peptídeos conjugados com β CG-ala

Peptídeo	Nenhum [IC ₅₀ μM]	GSGGS [IC ₅₀ μM]	ASASS [IC ₅₀ μM]	Ácido amino caproico [IC ₅₀ μM]
Phor21	2,3	3,27	2,77	2,75
Phor18	1,09*	2,32	2,07	NA
Phor15	1,92	2,96	1,48*	1,31*
Phor14	6,72	NA	NA	NA

Peptídeos conjugados com LHRH

Peptídeo	Nenhum [IC ₅₀ μM]		ASASS [IC ₅₀ μM]	
Phor21	1,31		NA	
Phor18	0,87		0,89	

[000189] Para determinar o efeito de substituições de D-aminoácidos, um constructo de fusão Phor21- β CG-ala foi sintetizado na forma de D enantiômero (referida posteriormente aqui como D-ala-Phor21- β CG-ala). Este constructo de fusão mostrou toxicidade comparável com células de câncer de mama MDA-MB-435S.luc *in vitro* (Phor21- β CG-ala 2,31 μM, D-ala-Phor21- β CG-ala 2,15 μM (**Tabela 3**); D-ala-Phor18- β CG-ala era 1,4 vez mais potente que Phor21- β CG-ala (IC₅₀ 1,6 μM), o correspondente de LHRH era significativamente mais potente que o D-enantiômero (Phor21-LHRH (IC₅₀ de 1,31 μM) comparado com D-ala-Phor21-LHRH com IC₅₀ de 0,75 μM, D-Phor18-LHRH com IC₅₀ de 1,42 μM e Phor18-Lupron com

IC₅₀ de 1,95 µM.

[000190] As IC₅₀ -valores para peptídeos líticos conjugados com βCG-ala e LHRH em células de câncer da mama MDA-MB-435S.luc são resumidas na **Tabela 3** e na Figura 3. Sucintamente, os peptídeos com IC₅₀ significativamente menor que Phor21-βCG-ala (2,31±0,16) eram: Phor28-βCG-ala (1,36 ±0,09 µM; p<0,0001), Phor15-ASAAS-βCG-ala (1,48±0,24 µM; p<0,005), Phor15-C₆-βCG-ala (1,31±0,17 µM; p<0,004) (C₆ = ácido 6 aminocaproico), Phor18-βCG-ala (1,09±0,17 µM; p< 0,0001), Phor21-LHRH (1,31±0,1 µM; p < 0,0001), D-ala-Phor21-LHRH (0,75±0,1 µM; p < 0,0001), Phor18-ASAAS-LHRH (0,88±0,12 µM; p < 0,0001), Phor18-LHRH (0,87±0,11 µM; p < 0,0001), (KKKFAFA)₃-LHRH (0,78±0,21 µM; p < 0,0004) e D-ala-Phor18-LHRH (1,42±0,08 µM; p < 0,004).

[000191] Os constructos de fusão de LHRH eram, em geral, mais potentes (mais tóxicas e de ação mais rápida, Figura 1) que os constructos de fusão de βCG-ala. Sucintamente, Phor21-LHRH, D-ala-Phor21-LHRH, Phor18-ASAAS-LHRH, Phor18-LHRH e controle de peptídeo 338614 ((KKKFAFA)₃ = peptídeo inativo) eram significativamente mais tóxicas para as células de câncer de mama humano comparadas com Phor21-βCG-ala (p<0,003). Todos os constructos de fusão de LHRH eram aproximadamente igualmente eficientes, exceto para LHRH-Phor21 que era significativamente menos potente quando a porção de ligação estava posicionada no terminal C em relação à porção lítica. D-ala-Phor18-LHRH era igualmente eficiente comparada com Phor21-LHRH; Phor18-Lupron era menos tóxica, mas comparável a Phor21-βCG-ala. (Figura 4, **Tabela 3**; Lupron é QHWSY(D-Leu)LRPNEt).

[000192] Os constructos de fusão com IC₅₀ - valores significativamente menores que Phor21-LHRH (1,34±0,1 µM) eram: D-

ala-Phor21-LHRH ($0,75 \pm 0,12 \mu\text{M}$; $p < 0,002$), Phor18-ASAAS-LHRH ($0,88 \pm 0,11 \mu\text{M}$; $p < 0,0001$), Phor18-LHRH ($0,87 \pm 0,12 \mu\text{M}$; $p < 0,004$) e (KKKFAFA)₃-LHRH ($0,78 \pm 0,21 \mu\text{M}$; $p < 0,04$). Quando os mesmos constructos de fusão eram comparados entre as porções de ligação $\beta\text{CG-ala}$ e LHRH, em todos os casos os constructos de fusão de LHRH eram significativamente mais tóxicas comparadas com seus correspondentes de $\beta\text{CG-ala}$.

Tabela 3: Peptídeos citolíticos e conjugados de peptídeos - resumo de características de IC_{50} e HA_{50} em células MDA-MB-435S.luc

ID do Peptídeo	Descrição	Conteúdo do peptídeo [%]	$\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$	$\text{HA}_{50} [\mu\text{M}]$	$\text{IC}_{50}/\text{HA}_{50}$
337464	Phor14- $\beta\text{CG-ala}$	84,9	$6,74 \pm 1,7^{***}$	1203 ± 586	0,005
323033	Phor21- $\beta\text{CG-ala}$	85,3	$2,31 \pm 0,16$	$73,44 \pm 6,9$	0,03
337465	Phor28- $\beta\text{CG-ala}$	85,1	$1,36 \pm 0,09^{**}$ *		
337466	Phor21-GSGGS- $\beta\text{CG-ala}$	84,6	$3,27 \pm 0,45$	$153,6 \pm 25$	0,02
337467	Phor18-GSGGS- $\beta\text{CG-ala}$	87,6	$2,32 \pm 0,44$	$723,6 \pm 219$	0,003
337468	Phor15-GSGGS- $\beta\text{CG-ala}$	85,7	$2,96 \pm 0,43$		
337469	Phor21-ASAAS- $\beta\text{CG-ala}$	83,5	$2,77 \pm 0,18$	$72 \pm 8,9$	0,037
337470	Phor18-ASAAS- $\beta\text{CG-ala}$	86,6	$2,07 \pm 0,2$	578 ± 241	0,0036
337471	Phor15-ASAAS- $\beta\text{CG-ala}$	86,2	$1,48 \pm 0,24^{**}$	421 ± 110	0,0035
337472	Phor21-C ₆ - $\beta\text{CG-ala}$	85	$2,25 \pm 0,3$		
337473	Phor18-C ₆ - $\beta\text{CG-ala}$	84,3	$3,9 \pm 0,9$		
337474	Phor15-C ₆ - $\beta\text{CG-ala}$	87,58	$1,31 \pm 0,17^{**}$ *	Não lítica	0
323033	Phor21- $\beta\text{CG-ala}$	85,3	$2,31 \pm 0,16$		
337476	Phor18- $\beta\text{CG-ala}$	84,1	$1,09 \pm 0,17^{**}$ *	$169,8 \pm 24$	0,006
337477	Phor15- $\beta\text{CG-ala}$	85,9	$1,92 \pm 0,43$		

ID do Peptídeo	Descrição	Conteúdo do peptídeo [%]	IC ₅₀ [μM]	HA ₅₀ [μM]	IC ₅₀ /HA ₅₀
337478	βCG-ala-Phor21	84	4,75±1,1		
337479	LHRH-Phor21	87,3	2,65±0,12	33±3,6	0,08
337480	Phor21-LHRH	82,4	1,31±0,1***	25±4,3	0,07
337481	(D Ala)-Phor21-βCG-ala	82,7	2,15±0,26	Não lítica	0
338982	Phor21	77,9	1,5±0,2 N=8	Não lítica	0
338983	Phor18	75,3	2,06±0,5 N=16	Não lítica	0
338984	(KKKFAFA) ₃ -βCG-ala	83,8	4,4±2,0 N=29	Não lítica	0
338611	(D ala)-Phor21-LHRH	85,1	0,75±0,1 N=8***	672,9±155	0,001
338612	Phor18-ASAAS-LHRH	78,9	0,88±0,12 N=36***	410,1±42	0,002
338613	Phor18-LHRH	81,4	0,87±0,11 N=17**	297,9±35	0,003
338614	(KKKFAFA) ₃ -LHRH	81,4	0,78±0,21 N=12***	95,7±46,7	0,008
337476	Phor18-βCG-ala V04099X1	84,2	1,22±0,16 N=16***	169,8±24	0,006
339385	D-ala-Phor18-LHRH	65,5	1,42±0,08 N=8***	Não lítica	0
339347	Phor18-Lupron	83,2	1,95±0,1 N=8	21±1,2	0,09

[000193] Significância comparada a Phor21-βCG-ala (323033) *** p < 0,0005, ** p < 0,005, * p < 0,05.

[000194] As atividades hemolíticas agudas para 21 constructos de fusão que incluem Phor18-Lupron e D-ala-Phor18-LHRH, foram estudadas. Os resultados são resumidos nas Figuras 5 e 6 e na **Tabela 3**.

[000195] A atividade hemolítica foi determinada em placas de 96 poços utilizando uma diluição em série de peptídeos expostos a 0,5% de RBC humana. Os controles eram solução salina (sem morte de RBC) ou 0,1% de Triton X 100 (100% de lise de RBC). As concentrações dos peptídeos variavam de 0 até 100 μM. As

incubações foram realizadas durante 2 h.

[000196] Para determinar a IC₅₀ de vários constructos de fusão sobre linhagens de células de cânceres humanos diferentes comparadas com a cisplatina, a IC₅₀ dos constructos de fusão foi avaliada como na **Tabela 3**. Os resultados são mostrados a seguir:

Valores de IC₅₀ [μM] em Linhagens de Células de Cânceres Humanos comparados com a Cisplatina

Linhagem de Células	Cisplatina	Phor18-LHRH	D-ala-Phor18-LHRH	Phor18-βCG	D-ala-Phor18βC G-ala
MDA-MB-435S.luc	Não determinado	0,86±0,16	1,42±0,08	1,35±0,15	1,6±0,16
MDA-MB-231	HCT	5,5±1,2	33,7±6,7	6,1±0,6	20,5±7,2
AN3-CA	11,85±0,16	3,8±0,08	40,6±0,15	22,15±0,16	36,8±0,16
OVCAR-3	184±0,16	3±0,5	13,8±0,3	8,8±0,4	11,6±0,3
SKOV-3	321±10	11,8±0,3	19,2±0,2	10,9±0,6	18,9±0,4
LNCaP	19,9±1,4	1,55±0,08	5,0±0,15	10,05±0,16	15,5±0,16

[000197] Linhagens de células de câncer de mama: MDA-MB-435S.luc, MDA-MB-231.

[000198] Linhagens de células de câncer de ovário OVCAR-3, SKOV-3.

[000199] Linhagem de células de câncer de próstata: LNCaP.

[000200] Linhagem de células de câncer endometrial: AN3-CA.

[000201] Os dados em geral indicam atividades hemolíticas muito baixas para os constructos de fusão estudados, exceto para Phor21-LHRH, LHRH-Phor21 e Phor18-Lupron. Sob condições similares, os constructos de fusão a seguir não mostravam qualquer atividade hemolítica (ver a Figura 5): Phor15-ácido aminocaproico-β-CG-ala (337474), D-ala-Phor21 β-CG-ala (337481) > 150.000 μM, Phor21, Phor 18 = CLIP71 não conjugada, (KKKFA FA)₃-βCG-ala, Phor 21 (338982), Phor18 = CLIP71 (338983), D-ala-Phor18-LHRH (339385) e

(KKKFAFA)₃-LHRH (338984). Os enantiômeros de D-aminoácidos não tinham atividade hemolítica mensurável.

[000202] Os constructos de fusão com atividades hemolíticas < 50 µM eram os seguintes: Phor21-LHRH (25 µM), LHRH-Phor21 (33 µM) e Phor18-Lupron (21 µM).

[000203] Os constructos de fusão com atividades hemolíticas > 100 µM eram as seguintes: Phor18-β-CG-ala (337476) e Phor18-LHRH (338613).

[000204] Os constructos de fusão com atividades hemolíticas entre 50-100 µM eram os seguintes: (KKKFAFA)₃-LHRH (95 µM), Phor21-βCG-ala e Phor21-ASAAS-βCG-ala tinham HA₅₀ similares de 70 µM.

[000205] Os constructos de fusão com atividades hemolíticas entre 400-1300 µM eram os seguintes: Phor14-βCG-ala (337464), Phor18 GSGGS β-CG-ala (337467), Phor18 ASAAS β-CG-ala, (337470), Phor15 ASAAS β-CG-ala (337471), D-ala-Phor21-LHRH (338611) e Phor18-ASAAS-LHRH (338612).

[000206] Um critério clinicamente significativo é a proporção de toxicidade celular (IC₅₀) e Atividade Hemolítica (HA₅₀) ou IC₅₀/HA₅₀ (Figura 6, **Tabela 3**). Estudos *in vivo* foram realizados utilizando uma concentração máxima de 10 µM de constructo de fusão que fica vários fatores abaixo dos valores de HA₅₀ medidos para a maioria dos constructos de fusão.

[000207] Os conjugados de LHRH com D-ala-Phor21, Phor18-ASAAS, D-ala-Phor18 e Phor18 tinham proporções de IC₅₀/HA₅₀ muito baixas de 0,001-0,006 (comparar Phor21-βCG-ala 0,03). A toxicidade para as células MDA-MB-435S.luc é significativamente maior comparada com Phor21-βCG-ala: D-ala) Phor21-LHRH é 3 vezes mais tóxica que Phor21-βCG-ala, Phor18-LHRH e Phor18-ASAAS-LHRH é 2 vezes mais potente, D-ala-Phor18-LHRH é 1,5 vez mais potente (Figura 6).

[000208] Em resumo, os constructos de fusão avaliados pelos critérios de maior toxicidade e menor atividade hemolítica (proporção de IC_{50}/HA_{50}) seriam: Phor18- β CG-ala, Phor18-ASAAS- β CG-ala, Phor15-ASAAS- β CG-ala, Phor15-C6- β CG-ala, D-ala-Phor21-LHRH, Phor18-LHRH, Phor18-ASAAS-LHRH e D-ala-Phor18-LHRH.

Exemplo 3

[000209] Este exemplo descreve estudos *in vivo* em um modelo de xenoenxerto de camundongo de câncer de mama com vários tipos e doses de constructos de fusão de β CG e LHRH.

[000210] Fêmeas de camundongos Nu/Nu receberam injeção subcutânea de uma suspensão MDA-MB-435S.luc/Matrigel HC (1×10^6 células). O planejamento do tratamento é mostrado na Figura 7. Sucintamente, o tratamento começava no dia 13 após a injeção de células tumorais e continuava nos dias 19 e 25. Os tratamentos eram: controle de solução salina, Phor21 (5 mg/kg), Phor18 (5 mg/kg), (KKKFAFA)₃ peptídeo - β CG-ala (5 mg/kg), Phor21- β CG-ala (0,01, 1 e 5 mg/kg), Phor18- β CG-ala (0,01, 1 e 5 mg/kg), D-ala-Phor21- β CG-ala (0,01, 1 e 5 mg/kg), linha de base 8-12 camundongos por grupo, 14 grupos. As doses para injeções semanais eram 5, 1 e 0,01 mg/kg de peso corporal, fornecidas na forma de uma única injeção em bolo.

[000211] Todos os grupos de camundongos toleraram as injeções bem. Somente um camundongo morreu em cada injeção com 337476 na dose de 5 mg/kg. A morte era um evento agudo. Todos os camundongos em outros grupos de tratamento sobreviveram. Nenhum camundongo morreu como uma consequência de injeção mais que 10 minutos após a injeção.

[000212] O efeito de injeções de peptídeos citolíticos sobre os tumores primários é ilustrado na Figura 8. Sucintamente, as Figuras 8A-8C mostram o volume de tumor durante o curso do estudo para cada peptídeo individual. As Figuras 8D-8G mostram as características

dos tumores na necropsia: volume do tumor (D), peso do tumor (E), células tumorais vivas (F), condições do tumor (G).

[000213] A eficácia de tratamento foi calculada como a diferença entre medidas no início do tratamento comparadas com a medida no final do estudo (Figuras 8H-8I). A Figura 8J mostra o peso corporal de camundongos na necropsia. A viabilidade de células nos tumores foi determinada no final do estudo quando os tumores foram medidos em relação à atividade de luciferase.

[000214] O volume do tumor diminuiu significativamente em todos os animais tratados com peptídeos que contêm β CG como um ligante (II, A), $p < 0,05$ comparados com a linha de base (exceto para 323033) em 0,01 mg/kg e a (KKKFAFA)₃- β CG-ala, a Phor 21 e o controle de Phor 18 = CLIP71 não conjugada. Os volumes dos tumores eram significativamente reduzidos comparados com o controle de solução salina em todos os grupos de tratamento exceto para (KKKFAFA)₃- β CG-ala, Phor 21 e Phor 18, que eram ineficientes na redução do volume do xenoenxerto.

[000215] Os pesos dos tumores também diminuíram significativamente ($p < 0,001$) em todos os grupos de tratamento com peptídeos conjugados com β CG quando comparados com animais tratados com solução salina ou (KKKFAFA)₃ peptídeos. A viabilidade de células tumorais, que é medida pela atividade da luciferase, se correlacionava bem com as alterações observadas nos pesos dos tumores e nos volumes dos tumores.

[000216] A eficácia do tratamento medida como a redução de peso do tumor ou de células tumorais viáveis comparada com os valores da linha de base mostrou uma resposta ao tratamento dependente da concentração para 323033 e 337476. 337481 mostrou uma redução consistente da carga tumoral e de células tumorais vivas em dosagens de 0,01, 1 e 5 mg/kg. 323033 era mais eficiente na dose de 1 mg/kg

comparada com 5 mg/kg (isto já foi observado pelos presentes inventores em experimentos anteriores), mas é apenas significativamente diferente do controle de solução salina na dose mais baixa aplicada. Os constructos de fusão 337476 e 337481 são significativamente mais eficientes em 5 e 0,01 mg/kg comparados com 323033 ($p < 0,0001$) na redução de cargas tumorais e de células tumorais viáveis ($p < 0,004$) abaixo dos valores da linha de base. O constructo de fusão 337481 não exhibe dependência da concentração e era o mais eficiente de todos os constructos testados.

[000217] Os tumores císticos foram observados em camundongos tratados com os constructos de fusão 337476 e 337481, que ocorriam a 80-90%, mas somente a 30% no grupo de tratamento com 323033 de 1 mg/kg. (A formação de cistos não foi observada neste modelo de xenoinxerto. Os cistos consistiam em cápsulas cheias de líquido.) Embora não seja evidente, foi postulado que tumores císticos ocorrem quando as células são mortas rapidamente em um tumor de crescimento rápido. Os cistos estavam presentes em xenoinxertos de tumor de próstata tratados com Phor 21.

[000218] Os resultados da química do sangue e de contagens de sangue completo para os grupos de tratamento revelaram que em nenhum caso os tratamentos afetaram a função hepática, renal, cardíaca. A contagem de plaquetas, as contagens de WBC e RBC estavam dentro da faixa normal, indicando que o tratamento especificamente mata células tumorais e não causava anemia na concentração fornecida nem afetava qualquer outra função corporal vital que pudesse ser observada. Os constructos de fusão eram bem tolerados sem efeitos colaterais em longo prazo.

[000219] Com base nos dados de eficácia sobre tumor *in vivo* anteriores, Phor18- β CG-ala (337476) e D-ala-Phor21- β CG-ala (337481) são significativamente mais potentes que a Phor21- β CG-ala

(323033) de referência em relação à redução do peso do tumor ($p < 0,0001$) e à destruição de células tumorais viáveis ($p < 0,004$) comparadas com os valores da linha de base. Ambos os constructos de fusão não causavam hemólise *in vivo* e não exibiam efeitos colaterais persistentes na dose mais alta utilizada (5 mg/kg). É possível que a eficácia sobre o tumor de Phor18- β CG-ala fosse maior com várias injeções mesmo na dose mais baixa.

[000220] Para os constructos de fusão de LHRH, foi utilizado o modelo de xenoenxerto de camundongo para câncer de mama. Sucintamente, fêmeas de camundongos Nu/Nu, linhagem intracruzada, de 5 semanas de idade (Charles River) receberam injeção subcutânea de uma suspensão de MDA-MB-435S.luc/Matrigel (1×10^6 células). O tratamento foi iniciado no dia 21 após a injeção de células tumorais e continuado nos dias 26 e 29. As doses para injeções de constructos de fusão semanais eram de 2, 0,2 e 0,02 mg/kg de peso corporal, fornecidas na forma de uma única injeção em bolo. Todos os camundongos foram submetidos à necropsia 34 dias após a injeção de células tumorais - os valores da linha de base para os pesos dos tumores foram obtidos através do sacrifício de 8 camundongos no início do tratamento. Os tumores primários, o fígado, os rins, o pâncreas, o coração, os pulmões e o baço foram coletados e preparados para avaliação histológica em formalina. Os pesos dos tumores foram registrados na necropsia, parte dos tumores foi congelada a -80°C para a determinação do ensaio da luciferase.

[000221] Os grupos de tratamento incluíam controle de solução salina, Phor21- β CG-ala - 323033 (0,02, 0,2 e 2 mg/kg), D-ala-Phor21-LHRH - 338611 (0,02, 0,2 e 2 mg/kg), (KKKFAFA)₃ LHRH - 338614 (5 mg/kg), Phor18-LHRH - 338613 (0,02, 0,2 e 2 mg/kg), Phor18-ASAAS-LHRH - 338612 (0,02, 0,2 e 2 mg/kg), D-ala-Phor18-LHRH - 339385 (0,02, 0,2 e 2 mg/kg) e Phor18-Lupron - 339347 (0,02, 0,2 e 2 mg/kg),

linha de base 12 camundongos por grupo.

[000222] Todos os grupos toleraram bem as injeções. Apenas dois camundongos morreram durante a segunda e a terceira injeção com Phor18-ASAAS-LHRH na dose de 2 mg/kg (estes camundongos eram da mesma gaiola). A morte foi um evento agudo. Todos os camundongos nos outros grupos de tratamento sobreviveram. Nenhum camundongo morreu como uma consequência de injeção mais que 10 minutos após a injeção.

[000223] A Figura 9 resume os efeitos das injeções de constructos de fusão sobre os tumores primários na forma de medidas do volume durante o curso do estudo para cada constructo individual. Em todos os grupos os volumes dos tumores diminuíram durante o tratamento exceto para camundongos tratados com o conjugado (KKKFAFA)₃-LHRH ou no controle de solução salina, quando o crescimento exponencial do tumor foi observado. O volume do tumor registrado após 30 dias pós-tratamento mostra uma redução ($p < 0,01$) comparada com a linha de base para todos os constructos de fusão com os volumes dos tumores menores registrados nos grupos de tratamento com Phor18-ASAAS-LHRH e Phor18-LHRH.

[000224] As características dos tumores na necropsia são resumidas na Figura 10: (A) peso do tumor, (B) alterações de pesos dos tumores comparados com a linha de base, (C) número total de células tumorais vivas, (D) alterações das células tumorais vivas totais comparadas com a linha de base e (E) pesos corporais na linha de base e na necropsia. A viabilidade das células tumorais foi determinada no final do estudo quando os tumores foram medidos em relação à atividade da luciferase. A eficácia de tratamento foi calculada como uma diferença entre as medidas no início do tratamento comparadas com a medida no final do estudo (Figuras 10B e 10D).

[000225] Os pesos dos tumores e os números totais de células

tumorais vivas diminuíram significativamente em todos os animais em todos os grupos de tratamento mesmo na dose mais baixa de 0,02 mg/kg quando conjugados de LHRH eram fornecidos comparados com o controle de solução salina e ao peptídeo conjugado (KKKFAFA)₃-LHRH ($p < 0,0001$). Os pesos totais dos tumores diminuíram comparados com a linha de base significativamente em todos os animais tratados com 2 mg/kg de peptídeos que contêm LHRH e em 0,02, 0,2 e 2 mg/kg para D-ala-Phor18-LHRH (A), ($p < 0,05$).

[000226] As concentrações a seguir resultaram em pesos dos tumores similares à linha de base: Phor21- β CG-ala - (323033) em 0,02 mg/kg ($p < 0,07$) e 0,2 ($p < 0,06$); Phor18-Lupron na dosagem de 0,2 e 0,02 mg/kg, Phor18-LHRH em 0,2 mg/kg e D-ala-Phor21-LHRH em 0,2 mg/kg. Quando os pesos totais dos tumores foram comparados com a dose de 0,02 mg/kg de Phor21- β CG-ala, Phor18-ASAAS-LHRH e D-ala Phor18-LHRH eram superiores à dosagem de 0,02 mg/kg ($p < 0,05$).

[000227] O número de células tumorais vivas foi determinado e representado graficamente na Figura 10C na forma do número total de células tumorais vivas e na Figura 10D na forma de alterações nas células tumorais vivas comparadas com a linha de base. A viabilidade celular, que é medida pela atividade da luciferase, se correlacionava com as alterações observadas no peso do tumor e no volume do tumor exceto para Phor18-ASAAS-LHRH e Phor18-LHRH, em que foi observada uma redução de células tumorais vivas. O tratamento com D-ala-Phor18-LHRH (339385) e Phor18-ASAAS-LHRH (338612) era superior ao com Phor21- β CG-ala na dose de 2 mg/kg ($p < 0,04$).

[000228] A eficácia de tratamento medida como uma redução do peso do tumor ou de células tumorais viáveis comparada com os valores da linha de base mostrou uma resposta ao tratamento dependente da concentração para todos os constructos de fusão exceto para D-ala-Phor21-LHRH considerando os pesos dos tumores

e as células tumorais vivas. D-ala-Phor18-LHRH mostrou uma redução coerente dos pesos dos tumores e das células tumorais vivas nas dosagens de 0,02, 2 e 2 mg/kg. Os constructos de fusão mais eficientes neste experimento eram Phor18-ASAAS-LHRH (338612) e D-ala-Phor18-LHRH (339385) na redução do número de células tumorais vivas e dos pesos dos tumores em 2 mg/kg. Phor18-ASAAS-LHRH e D-ala-Phor18-LHRH eram superiores à dose de 2 e 0,02 mg/kg de Phor21- β CG-ala, ($p < 0,05$). Phor18-Lupron era menos eficiente na redução do peso do tumor e de células tumorais vivas.

[000229] Os resultados da química do sangue e da contagem de sangue total para os grupos de tratamento revelaram que em nenhum caso os tratamentos afetaram a função hepática, renal, cardíaca. A contagem de plaquetas, as contagens de WBC e RBC estavam dentro da faixa normal, sugerindo que o tratamento destrói especificamente os tumores e não causava anemia na concentração fornecida e não afetava quaisquer outras funções corporais vitais que pudessem ser observadas. Níveis elevados de potássio de 1,5 vezes comparados com o controle de solução salina foram observados em camundongos que receberam injeção de Phor18-Lupron, Phor18-LHRH e D-ala-Phor21-LHRH. Os constructos de fusão eram bem tolerados sem efeitos colaterais de longo prazo.

[000230] Com base nos dados de eficácia sobre o tumor *in vivo* anteriores, Phor18-ASAAS-LHRH (338612) e D-ala-Phor18-LHRH (339385) são significativamente mais potentes que a Phor21- β CG-ala de referência em relação à redução do peso do tumor ($p < 0,05$) e à destruição de células tumorais viáveis ($p < 0,04$). D-ala-Phor21-LHRH e Phor18-LHRH eram igualmente eficientes a Phor21- β CG-ala. Ambos os constructos de fusão não causaram hemólise *in vivo* ou outros efeitos colaterais. É possível que a eficácia de Phor18-ASAAS-LHRH (338612) e D-ala-Phor18-LHRH (339385) fosse maior com várias

injeções mesmo na dose mais baixa.

Exemplo 4

[000231] Este exemplo descreve estudos de expressão e de especificidade do receptor *in vitro* e *in vivo*.

[000232] A densidade de expressão do receptor de LH tanto antes quanto depois do tratamento será analisada para determinar se o tratamento resulta na regulação para menos da expressão do receptor. Imunocitoquímica em comparação aos ensaios de Western Blot e RIA para quantificação. Determinação dos receptores de LH e de LHRH em células MDA-MB-435S.luc, células CHO e TM4 células utilizando IHC com lâminas em câmara e técnicas de Western Blot. O mesmo número de passagens de cada linhagem de células será testado em relação à sensibilidade ao peptídeo lítico CG e ao peptídeo lítico LHRH.

[000233] A especificidade dos constructos de fusão do receptor de LH foi analisada em células MDA-MB-435S.luc (tanto receptores de LHRH quanto de CG), TM4 (sem receptores de LHRH) e CHO (sem receptores de CG). Os dados de IC₅₀ mostram uma redução significativa na sensibilidade em células TM4 para LHRH-Phor21 (10,9 µM), enquanto que as células CHO mostram baixa sensibilidade a Phor21-βCG-ala (24,6 µM) quando comparadas às células MDA-MB-435S.luc (2,3 µM) (Figura 12).

[000234] A expressão do receptor *in vivo* é medida em associação com o tratamento com o constructo de fusão. A expressão do receptor *in vivo* é medida no início e no final do tratamento com o constructo de fusão.

Exemplo 5

[000235] Este exemplo descreve o tratamento de combinação com os constructos de fusão e um agente quimioterapêutico.

[000236] Estudos preliminares de linhagens de células de câncer de

ovário (células OVCAR-3, resistentes a vários fármacos) incubados durante 48 h com Phor21- β CG-ala e doxorrubicina foram realizados. A viabilidade celular foi determinada na forma de uma redução de formazan. Um decréscimo de IC_{50} com o aumento do tratamento com doxorrubicina na incubação simultânea com Phor21- β CG-ala. O decréscimo é de 10 μ M para 0,9 to 0,3 até 0,05 μ M em concentrações de doxorrubicina de 0, 0,5, 2 e 10 μ g/mL. (Figura 11). O tratamento com Phor21- β CG-ala potencializava a resposta à doxorrubicina. Os dados mostraram que Phor21- β CG-ala é mais eficiente (13 vezes) quando as células são co-incubadas com doxorrubicina.

[000237] O pré-tratamento de células cancerosas com doxorrubicina ou cisplatina, seguido pelo tratamento com constructos de fusão de LH ou de LHRH na presença e na ausência de LH ou LHRH, mostrará se a citotoxicidade de células o constructo é alterado.

[000238] A eficiência *in vivo* do tratamento de combinação foi testada em um modelo de tumor de xenoenxerto (MDA-MB-435S). Os camundongos são tratados com uma combinação de um constructo de fusão e um fármaco quimioterapêutico e comparados com os controles apropriados. Os camundongos foram tratados de acordo com o planejamento padronizado utilizado para o fármaco e são tratados uma vez por semana durante 3 semanas com o constructo de fusão.

[000239] Os conjugados de fusão possuem uma margem de segurança alta considerando parâmetros tais como atividade hemolítica, dose tolerada máxima (MTD) (até 16-25 mg/kg) em comparação com a dose eficiente antitumor (0,02 ou 0,01 mg/kg). A margem de segurança para Phor21- β CG-ala é de 16 enquanto um valor de 800 pode ser atingido para Phor18- β CG-ala e Phor18-LHRH. Em comparação a margem de segurança para Phor18-Lupron é de apenas 8.

[000240] A **Tabela 6** a seguir é um resumo dos conjugados de acordo

com vários critérios.

Peptídeo	Veze de maior atividade <i>in vitro</i> ¹	Atividade hemolítica [μM] ²	IC ₅₀ /HA ₅₀	Desempenho <i>in vivo</i> comparado com 33 ⁴	MTD mg/kg ⁵	Classificação do Desempenho
Phor21-βCG-ala (33)	1	73,4	0,03	1	16	
D-ala-Phor18-LHRH (85)	1,5	Não lítica	0	Superior	25	14
Phor 18-βCG-ala (76)	2,11	169	0,006	Superior	16	13
Phor18-LHRH (13)	2,65	297	0,003	1	16	13
D-ala-Phor21-βCG-ala (81)	1	Não lítica	0	Superior	8	11*
Phor18-ASAAS-LHRH (12)	2,62	410	0,002	Superior	Nenhum dado	11
D-ala-Phor21-LHRH (11)	3,08	672	0,001	1	Nenhum dado	10 ^a
Phor18-Lupron (47)	1	21	0,04	Menor	16	5
71	1,6	421	0,003	Nenhum dado	Nenhum dado	
74	1,8	Não lítica	0	Nenhum dado	Nenhum dado	

Código de classificação:

Pontos alocados: 1 2 3

Atividade *in vitro* 1x 2x 3x

$HA_{50} < 50$ 50-100 > 100

$IC_{50}/HA_{50} < 0,03$ $< 0,006$ $< 0,004$

Eficácia *in vivo*

Comparado com 33 igual melhor

MTD comparada

A 33 igual melhor

1) IC_{50} de 33 era de 2,31 μM , valores expressos na forma de IC_{50} de 33/ IC_{50} peptídeo.

2) Atividade hemolítica expressa na forma de HA_{50} [μM].

3) O desempenho *in vivo* refere-se à significância na redução do peso do tumor e na redução de células tumorais vivas vs valores da linha de base comparado com os mesmos parâmetros do peptídeo 33.

4) Dose injetada resultando em 66,6% de sobrevivência (aguda e 8-14 dias pós-injeção).

Códigos dos peptídeos:

33 = Phor21 β CG-ala

76 = Phor18- β CG-ala

81 = D ala Phor21- β CG-ala

85 = D ala Phor18-LHRH

47 = Phor18-Lupron

13 = Phor18-LHRH

11 = D ala Phor21-LHRH

12 = Phor18-ASAAS-LHRH

71 = Phor15- β CG-ala

74 = Phor15-C6- β CG-ala

Exemplo 6

[000241] Este exemplo descreve os estudos da cinética *in vitro* do

peptídeo KFAKFAKKFAKFAKKFAKQHWSYGLRPG (Phor18-LHRH (338613)) em várias linhagens de células de câncer.

[000242] Os fármacos quimioterapêuticos padronizados interagem através da intercalação do DNA, da interação de microtúbulos ou são inibidores das vias de transdução de sinal. Consequentemente, seu mecanismo de ação determina o período de tempo necessário para destruir as células -alvo. A cinética para a doxorrubicina *in vitro* para destruir as células de câncer de mama humano tal como MDA-MB-435S foi relatada como sendo tão rápida quanto 4 horas e outro padrão de tratamentos de cuidado pode levar ainda mais tempo. O mecanismo de ação mais comum na destruição das células cancerosas é a apoptose. Como um processo reversível e devido à ocorrência de resistência a vários fármacos (MDR), a ação de bombas de Pgp que exportam moléculas de fármaco em células cancerosas MDR, padrão de tratamentos de cuidado pode ser ineficiente.

[000243] Em contraste aos fármacos quimioterapêuticos, a ação direta sobre a membrana pode destruir as células cancerosas dentro de minutos. Os compostos ativos sobre a membrana tais como peptídeos líticos catiônicos incluem Phor18-LHRH (338613) (KFAKFAKKFAKFAKKFAKQHWSYGL RPG).

[000244] Para determinar a cinética da citotoxicidade foram realizados estudos ao longo do tempo detalhados utilizando Phor18-LHRH (338613) em comparação com a porção do peptídeo lítico Phor 18 = CLIP71 (338983) não direcionado em várias linhagens de células expressando receptores -alvos de LHRH em vários níveis. As membranas de linhagens de células não cancerosas são neutras e são resistentes aos peptídeos citolíticos, em contraste às linhagens de células de câncer, que possuem um conteúdo de ácido fosfatídico alto na sua membrana externa.

[000245] As linhagens de células de câncer de mama estudadas

eram MDA-MB-435S (negativa para o receptor alfa de estrogênio), MCF-7 e T47D (positiva para o receptor alfa de estrogênio), linhagens de células de câncer de ovário (OVCAR-3 e SKOV-3), de câncer de próstata (LNCaP), a linhagem de células epiteliais de mama não malignas MCF-10A e a linhagem de células de fibroblasto de camundongo NIH:3T3. A função do direcionamento do receptor de LHRH na eficácia de Phor18-LHRH (338613) também foi avaliada.

[000246] As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 10.000 células/poço. O tratamento foi iniciado após 48 h através da adição de Phor18-LHRH (338613) (APC 338613, Lote # P080401) ou Phor18 = CLIP71 (APC 338983, Lote # W08033C1) em concentrações de 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 50 e 100 μ M. Os controles continham solução salina USP ou 0,1% de TritonX-100TM como referência para 0 e 100% de morte celular, respectivamente. As incubações foram terminadas através da remoção do meio de cultura após 2 minutos, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 24 e 48 horas. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de conversão de formazan (ensaio MTT, (CellTiter 96 Aqueous One, Promega # G3582). A conversão de formazan foi determinada utilizando o espectrofotômetro de microplacas BioRad Benchmark Plus com comprimentos de onda duais em 490/630 nm à temperatura ambiente).

[000247] Os dados foram calculados na forma da fração da absorção em poços contendo TritonX-100TM representando 100% de morte celular versus 0% de morte celular em poços contendo solução salina. A citotoxicidade foi determinada como a IC₅₀ utilizando GraphPad Prism versão 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA de acordo com o programa para resposta a dose sigmoidal com inclinação da reta variável utilizando valores de restrição de 0 e 100%. 4 poços de cada conjunto individual de duas

placas de 96 poços foram comparados e analisados. A análise estatística para a significância foi determinada através de um teste T de Student com duas extremidades.

[000248] Nas células MDA-MB 435S (p250) Phor18-LHRH (338613) exibiu sua eficácia máxima após 1 hora de incubação enquanto que as incubações com CLIP71 resultou em valores de IC₅₀ de 100, 109, 171, 145, 148, 86, 54,5, 55,1 (24 horas) e 3 [μM] (48 horas) (p<0,005) com tempo de incubação crescente. Phor18-LHRH (338613) é um agente de atuação rápida (1,2 μM 0,5 hora e 0,6 μM após 1 hora) comparada com o peptídeo lítico CLIP71 não conjugado (> 100 μM).

[000249] Nas células MCF-7 (p152) Phor18-LHRH (338613) exibiu sua eficácia máxima após 1 hora de incubação enquanto que incubações com CLIP71 resultou em valores de IC₅₀ de 92, 95, 50 e 22 [μM] (p<0,005) com tempo de incubação crescente. Phor18-LHRH (338613) é um agente de ação rápida (3,4-1,8 μM) comparada com o CLIP71 não conjugado.

[000250] Nas células OVCAR-3 (p47) Phor18-LHRH (338613) exibiu sua eficácia máxima após 1 hora de incubação enquanto que Phor18 = CLIP71 não conjugado (33 incubações resultaram em valores de IC₅₀ de 337, 126, 85,5, 52,5, 22,9 e 23,1 [μM] (p<0,005) com tempo de incubação crescente. Phor18-LHRH (338613) é um agente de ação rápida com valores de IC₅₀ de 6,7, 5,6, 5,3, 1,6, 1,5, 0,5 e 0,5 [μM] (p<0,005) com tempo de incubação crescente. Os dados de cinética rápida sugerem que Phor18-LHRH (338613) e CLIP71 matam as células através de um mecanismo diferente de ação e aumenta a eficácia do fármaco.

[000251] Nas células SKOV-3 (p40) Phor 18-LHRH (338613) exibiu sua eficácia máxima (11,5 μM) após 24 horas de incubação enquanto que incubações com CLIP71 resultaram em valores de IC₅₀ de 86, 96, 53 e 50 [μM] (p<0,005) com tempo de incubação crescente. Phor18-

LHRH (338613) não é um -alvo apropriado para as células SKOV-3 uma vez que estas células não apresentam receptores de LHRH funcionais.

[000252] Todas as linhagens de células que apresentam receptores de LHRH funcionais tais como células de câncer de mama (MDA-MB-435 e MCF-7) e OVCAR-3 tratadas com Phor 18-LHRH (338613) demonstraram o efeito máximo (IC_{50} em μM) dentro 0,5-1 hora de incubação. Em contraste, 24 horas incubação eram necessárias para o efeito máximo de CLIP71. Resultados similares foram obtidos para as linhagens de células que apresentam receptores de LHRH funcionais tais como T47D, LNCaP. Nas linhagens de células que não apresentam receptores de LHRH funcionais (SKOV-3 e HEK 1A), Phor 18-LHRH (338613) e Clip71 exibiam toxicidade similar com valores de IC_{50} de 10,3 resp 11,8 μM após incubações de 24 horas. A linhagem de células não cancerosas 3T3 era altamente resistente a Phor 18-LHRH (338613) e CLIP71 com valores de IC_{50} de $> 40 \mu M$ para CLIP-71 e $>10 \mu M$ para Phor 18-LHRH (338613).

[000253] Estes resultados indicam que o direcionamento de LHRH aumenta a eficácia de CLIP71 e que as linhagens de células não cancerosas são resistentes à destruição por peptídeos catiônicos citolíticos. Phor18-LHRH (338613) mostra potência notável na destruição das células cancerosas através de um mecanismo direcionado para o receptor dentro de menos de 1 hora. Phor18-LHRH (338613) é eficiente dentro minutos e possui vantagens em relação à quimioterapia padrão que depende da captação intracelular e da interferência com vias metabólicas e maquinaria de proliferação para eficácia. Além disso, Phor18-LHRH (338613) é capaz de atuar sobre células cancerosas resistentes a vários fármacos.

Exemplo 7

[000254] Este exemplo inclui dados que indicam um mecanismo de

ação provável do peptídeo KFAKFAKKFAKFAKKFAKQHW SYGLRPG (Phor18-LHRH (338613)) sobre células de câncer de mama *in vitro*.

[000255] Para demonstrar um mecanismo de ação possível *in vitro* foi realizado um estudo por microscopia fluorescente na linhagem de células de câncer de mama humano MDA-MB-435 que superexpressam receptores de LHRH. Sucintamente, as células de câncer de mama humano (MDA-MB-435, passagem # 252) foram semeadas sobre placas de cultura. Os marcadores a seguir foram introduzidos antes da adição de EP100: DRAQ5™ (Alexis Corporation) - azul - foi utilizado para corar o núcleo e MitoTracker® Red CMXRos (M7512) (Molecular Probes, Inc. OR) foi aplicado para visualizar mitocôndrias intactas. As membranas celulares foram coradas com conjugados verdes de flúor alexa e gérmen de trigo (Molecular Probes, Inc. OR).

[000256] As células foram carregadas primeiramente com o corante Mitotracker, de acordo com a recomendação do fabricante. Phor18-LHRH (338613) reconstituída em solução salina foi adicionada em uma concentração final de 10 µM e incubada durante 5-10 minutos. As placas de cultura apenas com solução salina serviam como controle. O sobrenadante foi removido e o restante das células foi preparado para obtenção de imagens por microscopia fluorescente.

[000257] Uma avaliação por microscopia fluorescente de células de câncer de mama MDA-MB-435 apresentando receptores de LHRH funcionais *in vitro* após a exposição a Phor18-LHRH (338613) revelou a desintegração da membrana plasmática após uma exposição de 5 minutos a Phor18-LHRH (338613) (10 µM). Estas observações sugeriram que Phor18-LHRH (338613) destruíam a membrana plasmática, levando à morte da célula dentro minutos.

[000258] Uma avaliação por microscopia fluorescente de SKOV-3 (p 41) e células MDA-MB-435S (p 250) em culturas incubadas durante 30 minutos com 2 µM de Phor18-LHRH (338613) FITC revelou que nas

células SKOV-3 a captação intracelular estava ausente, não ocorria a formação de bolhas na membrana e o corante mitocondrial foi mantido. Em contraste nas células MDA-MB-435S a captação intracelular de Phor 18-LHRH (338613) FITC era visível dentro de 30 minutos bem como a formação de bolhas extensiva na membrana levando à formação de vesículas da membrana externa e ao desaparecimento do corante mitocondrial. Estas observações sugerem que a morte celular ocorria dentro minutos.

[000259] Em minutos, Phor18-LHRH (338613) destruía as células que apresentam receptores de LHRH funcionais. Phor18-LHRH (338613) destruía as células cancerosas através da desintegração da membrana plasmática externa levando à necrose. O mecanismo de ação sugere fortemente uma interação rápida de Phor18-LHRH (338613) com a membrana plasmática de células que apresentam o alvo funcional. As células que eram negativas para os receptores de LHRH não eram um alvo e permaneciam intactas.

[000260] Estes dados mostraram alta especificidade e eficácia de Phor 18-LHRH (338613) como um fármaco anticâncer. Phor18-LHRH (338613) era eficiente dentro de minutos e tinha grandes vantagens sobre a quimioterapia padrão que requer captação intracelular e interferência com vias metabólicas e a maquinaria de proliferação para eficácia. Além disso, Phor 18-LHRH (338613) era capaz de atuar sobre células cancerosas resistentes a vários fármacos.

Exemplo 8

[000261] Este exemplo inclui estudos que demonstram que o peptídeo KFAKFAKKFAKFAKKFAKQHWSYGLRPG (Phor18-LHRH (338613)) era eficiente contra o câncer em modelos de xenoenxerto.

[000262] Os estudos de eficácia *in vivo* foram realizados na forma de monoterapia ou de uma terapia de combinação com padrão de tratamentos de cuidado em camundongos nus carregando

xenoinxertos de câncer de mama humano: MDA-MB-435S.luc (s.c.), MCF-7 (positiva para o receptor alfa de estrogênio), xenoinxertos de câncer de ovário humano: OVCAR-3, (s.c.), xenoinxertos de câncer de próstata humano: PC-3 (negativo para o receptor de androgênio). Phor18-LHRH (338613) dissolvida em solução salina (0,02, 0,2 e 2 mg/kg) foi injetada uma ou duas vezes por semana durante 3 semanas na forma de uma única injeção em bolo na veia caudal lateral.

[000263] As terapias de combinação PHOR 18-LHRH (338613) foram realizadas em um modelo de xenoinxerto de câncer de mama MCF-7.

[000264] Os camundongos foram sacrificados uma semana após a última injeção e o sangue foi coletado para a distribuição química, os pesos dos tumores e os pesos corporais foram registrados. Parte dos tumores foi fixada em 10% de formalina tamponada com PBS para avaliação histológica. Os vários estudos de xenoinxertos *in vivo* são resumidos na **Tabela 7**.

Tabela 7: Estudos de Xenoinxertos

Modelo de Xenoinxerto	Regime e Duração do Tratamento	Peso Médio do Tumor vs Linha de base $p < 0,05$	Peso Médio do Tumor vs Solução Salina $P < 0,05$	Comentários
OVCAR-3	1x3 semanas, 20 d	0,2 mg/kg	0,2, 2 mg/kg	Necrose em tumores tratados, redução de receptores de LHRH
MDA-MB-435S.luc	1x3 semanas, 22 d	0,02, 2mg/kg	0,02, 0,2 e 2 mg/kg	
MDA-MB-435S.luc	1x3wk, 22 d	0,002 mg/kg	0,0002 mg/kg	Necrose e redução de receptores de LHRH
PC-3	1 x 3 semanas, 21 d	0,2	0,002, 0,02, 0,2 mg/kg	
MCF-7	2x 3 semanas, 19 d		0,02 mg/kg retardo no crescimento	Necrose em tumores tratados 0,02 e 0,2

[000265] Para determinar a dose eficiente mínima necessária para reduzir os pesos dos xenoenxertos de MDA-MB-435S em um regime de dose única, fêmeas de camundongos Nu/Nu, linhagem intracruzada, de 5 semanas de idade (Charles River), receberam injeção (s.c.) na região interscapular de uma suspensão de MDA-MB-435S (passagem # 249)/Matrigel ($2,4 \times 10^6$ células/camundongo) [Leuschner 2006]. Phor18-LHRH (338613) (ID: 338613 lote# P080401) (0,00002, 0,0002, 0,002, 0,02, 0,2 e 1 mg/kg) e Phor18 = CLIP71 não conjugado (APC 338983, Lote # W08033C1) mais LHRH (0,2/0,122 mg/kg, ([D-Trp6]-LHRH; Sigma L9761, Lote # 037K1103) foram reconstituídos em USP solução salina antes da dosagem. As doses foram fornecidas na forma de uma única injeção intravenosa em bolo via veia caudal lateral uma vez por semana durante 3 semanas.

[000266] Cada grupo consistia em 16 camundongos, que receberam injeção uma vez por semana durante 3 semanas. Um grupo de 16 camundongos foi sacrificado no momento do início do tratamento para servir como linha de base. Injeções com solução salina serviram como grupos de controle. Durante todo o estudo os volumes dos tumores foram registrados duas vezes por semana.

[000267] O tratamento começava no dia 16 após a injeção de células tumorais quando os tumores eram estabelecidos e continuado nos dias 23 e 30. Todo o restante dos camundongos foi submetido à necropsia 37 dias após a injeção de células tumorais.

[000268] A resposta ao tratamento foi determinada pelos pesos dos tumores e da alteração nos pesos dos tumores na necropsia comparados com o controle de solução salina e o tratamento com CLIP71 não direcionado. Os tumores primários foram coletados, pesados e preparados para avaliação histológica em fixação com formalina com 10% de formalina tamponada com PBS. A avaliação estatística dos conjuntos de dados foi realizada em GraphPad Prizm 4

e a significância foi calculada através do teste "signed-rank" de Wilcoxon.

[000269] Os volumes dos tumores e os pesos dos tumores aumentaram no controle de solução salina e nos camundongos tratados com clip71 mais LHRH. Os volumes dos tumores e os pesos dos tumores foram reduzidos significativamente comparados com o controle de solução salina em camundongos tratados com 0,0002 mg/kg de Phor18-LHRH (338613). O tratamento com doses de Phor18-LHRH (338613) tão baixas quanto 0,002 mg/kg reduziu significativamente o volume do tumor e o peso do tumor comparados com a linha de base ($p < 0,0002$).

[000270] A avaliação histológica de seções de tumor de camundongos com xenoenxerto de MDA-MB-435S coradas com hematoxilina/eosina de tratados camundongos mostra células tumorais viáveis no controle de solução salina e em camundongos tratados com CLIP71/LHRH. Em contraste, uma necrose significativa era evidente em tumores de camundongos tratados com Phor18-LHRH (338613) em doses tão baixas quanto 0,0002 mg/kg. O peptídeo lítico catiônico CLIP71 não direcionado não diminuía os pesos dos tumores ou destruíam o tecido de tumor.

[000271] Phor18-LHRH (338613) era altamente eficiente na redução de pesos dos tumores de xenoenxertos de MDA-MB-435S em concentração tão baixa quanto 0,002 mg/kg levando à necrose em tecidos de tumor tratados. O tratamento não direcionado com peptídeos citolíticos é ineficiente.

[000272] Com a finalidade de determinar a dose eficiente mínima necessária para reduzir os pesos do xenoenxerto de MDA-MB-435S em um regime de várias doses, fêmeas de camundongos Nu/Nu, linhagem intracruzada, de 8 semanas de idade (Charles River), receberam injeção (s.c.) na região interscapular de uma suspensão de MDA-MB-435S

(passagem # 253)/Matrigel (2×10^6 células/camundongo) como descrito anteriormente acima. Phor18-LHRH (338613) (ID: 338613 lote# P080401) (0,002 e 0,2 mg/kg) foi reconstituída em USP solução salina antes da dosagem. As doses foram fornecidas na forma de uma única injeção intravenosa em bolo via veia caudal lateral nos dias 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42 após a inoculação de células tumorais. As injeções de solução salina serviram como grupos de controle.

[000273] Cada grupo de tratamento consistia em 16 camundongos. Durante todo o estudo os volumes dos tumores foram registrados duas vezes por semana. A necropsia final foi realizada no dia 45 após a injeção de células tumorais. As injeções foram reiniciadas devido à obstrução da veia caudal na maior parte dos camundongos. No final do estudo os pesos corporais, os pesos dos tumores foram determinados e fixados em 10% de formalina tamponada com fosfato.

[000274] O tratamento com hor18-LHRH (338613) utilizando várias injeções intravenosas resultou na regressão do tumor em ambos os níveis de doses. Os camundongos isentos de tumor foram observados em ambos os grupos de tratamento como 6/23 no grupo recebendo 0,002 mg/kg e 1/20 em 0,2 mg/kg. As massas residuais consistiam tipicamente de Matrigel. Um camundongo não respondia ao tratamento no grupo 0,2 mg/kg.

[000275] Não foi observada necrose nas caudas, não estava presente uma vermelhidão das caudas. Os pesos corporais não foram afetados pelo tratamento ao longo de todo o período do estudo.

[000276] A sobrevivência era de 100% nos camundongos tratados. Em contraste, 8 camundongos no controle de solução salina grupo foram sacrificados no dia 30 após a injeção de células tumorais (antes do término do estudo) porque o volume do tumor excedia 2.500 mm^3 .

[000277] A verificação histológica de tumores corados com H&E de

camundongos tratados com 0,002 e 0,2 mg/kg de Phor18-LHRH (338613) em um regime de várias injeções mostrou a erradicação de células tumorais em camundongos tratados. Em contraste, as células tumorais viáveis estavam presentes nos camundongos com controle de solução salina.

[000278] Phor18-LHRH (338613) destruía e reduzia os pesos dos tumores significativamente e prolongava o tempo de vida dos camundongos tratados. Os tratamentos não tinham quaisquer efeitos visíveis sobre o peso corporal ou a verificação dos órgãos.

Exemplo 9

[000279] Este exemplo inclui uma descrição dos estudos de eficácia do peptídeo KFAKFAKKFAKFAKKFAKQHWSYGLRPG (Phor18-LHRH (338613)) em modelos de xenoenxertos de câncer de mama, de ovário e de próstata.

[000280] Os estudos *in vitro* descritos aqui demonstraram que Phor18-LHRH (338613) é um agente de ação rápida, que mata as células cancerosas dentro de minutos de contato. Para determinar a eficácia de Phor18-LHRH (338613) sobre xenoenxertos de câncer de mama na fase inicial do tratamento direcionado, era estudada a cinética de destruição através de Phor 18-LHRH (338613) em um modelo de xenoenxerto de câncer de mama após uma única injeção de Phor18-LHRH (338613).

[000281] Sucintamente, fêmeas de camundongos Nu/Nu, linhagem intracruzada, de 5 semanas de idade (Charles River), receberam injeção (s.c.) na região interscapular com uma suspensão de MDA-MB-435S (passagem # 249)/Matrigel ($2,4 \times 10^6$ células/camundongo) como descrito no Exemplo 10. Phor18-LHRH (338613) (ID: 338613 lote# P080401) (0,2 e 2 mg/kg) foi reconstituída em USP solução salina antes da dosagem. As doses foram fornecidas na forma de uma única injeção intravenosa em bolo via veia caudal lateral.

[000282] Os camundongos foram sacrificados 1, 2 e 16 horas após o tratamento com Phor 18-LHRH (338613) ou solução salina. No término do estudo o peso corporal, os pesos dos tumores foram determinados e os tumores foram fixados em 10% de formalina tamponada com fosfato.

[000283] A avaliação histológica de seções coradas com H&E de tumores mostrou células tumorais viáveis com várias figuras mitóticas em camundongos tratados com solução salina. O tratamento com Phor18-LHRH (338613) em ambas as doses de 0,2 e 2 mg/kg exibiu uma destruição de tumores de xenoenxertos de MDA-MB-435S tão rápido quanto 1 hora após a injeção.

[000284] Phor18-LHRH (338613) destruía tumores tão logo quanto 1 h após a dosagem, sugerindo um mecanismo de atuação rápida que causa morte celular através de necrose. Estes dados confirmam que Phor18-LHRH (338613) atua através do contato de sua membrana com células tumorais que apresentam receptores de LHRH.

[000285] Para determinar a eficácia de Phor18-LHRH (338613) sobre xenoenxertos de câncer de ovário que se assemelham à doença humana, foram realizados estudos com uma única ou com várias doses. O modelo de xenoenxerto da linhagem de células de câncer de ovário humano OVCAR-3 que apresentam receptores de LHRH funcionais foi utilizado neste estudo. OVCAR-3 representa um modelo de xenoenxerto de crescimento lento e secreta o marcador de tumor (antígeno de câncer 125 ou CA125). Sua secreção pode ser utilizada como a resposta ao tratamento e é uma medida da atividade do fármaco.

[000286] A finalidade deste estudo de xenoenxerto era testar Phor 18-LHRH (338613) em um modelo de câncer de ovário, para determinar se Phor18-LHRH (338613) é eficiente *in vivo* em modelos de tumores que crescem lentamente resistentes a vários fármacos na

forma de únicas injeções semanais. Sucintamente, fêmeas de camundongos Nu/Nu, linhagem intracruzada, de 5 semanas de idade (Harlan-Sprague Dawley) receberam injeção subcutânea de uma suspensão de NIH:OVCAR-3 células/Matrigel ($4,6 \times 10^6$ células/camundongo). O tratamento foi iniciado no dia 33 após a injeção de células tumorais quando os tumores eram estabelecidos e continuado nos dias 41 e 47. As doses para 3 injeções semanais eram 0,02, 0,2 e 2 mg/kg de peso corporal, fornecidas na forma de uma única injeção intravenosa em bolo via veia caudal lateral administrada uma vez por semana durante três semanas nos dias 33, 41 e 47. As necropsias foram realizadas no dia 52. Os dados são apresentados como a média SEM. As setas mostram a dosagem.

[000287] Os grupos de tratamento incluíam o controle de solução salina (N=10), Phor18-LHRH (338613) (338613, V09108X1) (0,02 (N=10), 0,2 (N=10) e 2 mg/kg (N=9),) e Phor18 = CLIP71 não conjugado (APC 338983, Lote # V04004X1) (2 mg/kg (N=10)), Cisplatina/CP em solução salina (Calbiochem, Cat 232120, D0005495,) (10 mg/kg, 3qd (N=10),), linha de base (N=9).

[000288] Um grupo de 9 camundongos carregando tumor foi sacrificado no dia 33 e serviu como o grupo de linha de base. Todos os camundongos foram submetidos à necropsia 51 - 52 dias após a injeção de células tumorais. Os volumes dos tumores e os pesos corporais foram registrados duas vezes por semana durante o estudo, bem como foi realizado um exame veterinário dos camundongos.

[000289] Os tumores primários, o fígado, os rins, o pâncreas, o coração, os pulmões e o baço foram coletados, fixados em formalina e preparados para avaliação histológica. Os pesos dos tumores foram medidos na necropsia, parte dos tumores foi congelada a -80°C para a determinação do ensaio de receptores de LH/CG e de LHRH.

[000290] Como um biomarcador para a atividade do fármaco, o

CA125 foi determinado no soro, coletado de cada camundongo individual na necropsia utilizando um Ensaio Imunológico Ligado à Enzima para a determinação quantitativo antígeno de câncer de ovário CA125 (Assay kit Genway, Biotech, Inc. San Diego, CA, Catálogo # 40-052-115009, # BC-1013 de acordo com o fabricante).

[000291] Os níveis do receptor de LHRH foram avaliados partindo de tumores fixados com formalina. A análise de imagens de imunoperoxidase quantitativa foi realizada com o sistema de análise de imagens assistidas por computador adjuntivo com Ventana Image Analysis System (VIAS) conectado funcionalmente a um microscópio interativo (Axio Imager). A análise quantitativa foi realizada com o programa para quantificação do receptor de Her2/neu que incluía uma análise morfométrica e colorimétrica. Os resultados do estado do receptor foram relatados na forma da porcentagem de células que exibem coloração positiva dos receptores de LHRH sob os critérios a seguir: 0 não imunorreativas, 1+: 1-25% de positivas, 2+: 26 - 50% de positivas, 3+: 51-75% de células positivas.

[000292] Todos os grupos de camundongos toleraram bem as injeções. Um camundongo morreu durante a primeira injeção de Phor 18-LHRH (338613) na dose de 2 mg/kg. A morte era um evento agudo e era do procedimento e não relacionada ao tratamento. Todos os camundongos em outros grupos de tratamento sobreviveram. Nenhum camundongo morreu como uma consequência de injeção além de 10 minutos após a injeção.

[000293] Os volumes dos tumores diminuíram durante o tratamento com Phor 18-LHRH (338613). Em contraste, para os camundongos tratados com o CLIP71, a cisplatina ou no controle de solução salina, era observado um crescimento de tumor. Os volumes dos tumores registrados após 42 dias após a injeção de células tumorais exibiam reduções ($p < 0,001$) comparados com a linha de base em

concentrações de Phor18-LHRH (338613) tão baixas quanto 0,2 mg/kg de peso corporal.

[000294] As características dos tumores na necropsia (pesos médios dos tumores e alterações de pesos médios dos tumores comparados com a linha de base) foram determinadas. Os pesos dos tumores reduzidos comparados com o controle de solução salina e Phor 18 = CLIP71 não conjugado ($p < 0,05$) foram obtidos nos grupos para dosagens de 2 e 0,2 mg/kg de Phor18-LHRH (338613). Os camundongos isentos de tumores foram observados nos grupos de 0,2 e 2 mg/kg de Phor 18-LHRH (338613). A resposta ao tratamento medida como a regressão do tumor comparado com o início do tratamento era a maior em camundongos tratados com Phor18-LHRH (338613) em 0,2 mg/kg ($p < 0,03$ vs linha de base). A cisplatina e Phor18 = CLIP 71 não conjugado não eram eficientes na redução de pesos dos tumores.

[000295] Os camundongos tratados com o controle de solução salina, o CLIP71 e a cisplatina exibiam crescimento tumoral invariável. Os níveis no soro para CA125 correspondiam aos pesos dos tumores ($r^2 = 0,66$). A secreção de CA125 era reduzida em camundongos tratados com Phor18-LHRH (338613) e comparada com a do controle de solução salina era maior em camundongos tratados com Phor18-LHRH (338613) em 0,2 e 2 mg/kg ($p < 0,0002$).

[000296] Os tamanhos de tumor cortado de camundongos carregando xenoenxerto de OVCAR-3 após o tratamento com 0,02 mg/kg de Phor18-LHRH (338613) eram reduzidos e necróticos comparados com o controle de solução salina. Os tumores tratados exibiam uma redução dos níveis de receptores de LHRH em 1-2 pontos de escore. As seções de tumor coradas com hematoxilina/eosina exibiam necrose significativa nos grupos tratados com 0,02 mg/kg de Phor18-LHRH (338613). Os camundongos

carregando xenoenxertos tratados com Cisplatina ou CLIP71 não possuíam redução no volume do tumor, nos níveis de receptores de LHRH e exibiam células tumorais viáveis após a avaliação histológica.

[000297] O tratamento com Phor18-LHRH (338613) causava a regressão do tumor, a redução do marcador de tumor CA125 no plasma, a redução de níveis de receptores de LHRH e necrose no modelo de xenoenxerto de ovário. Phor18-LHRH (338613) é, portanto, eficiente na destruição de xenoenxertos de câncer de ovário resistentes a vários fármacos.

[000298] Para determinar a eficácia de Phor 18-LHRH (338613) sobre os xenoenxertos de câncer de próstata, foi estudado o efeito de Phor18-LHRH (338613) *in vivo* em um modelo de xenoenxerto agressivo com crescimento rápido. Os xenoenxertos de PC-3 não tratados causam perda de peso significativa em camundongos.

[000299] Sucintamente, machos de camundongos Nu/Nu, linhagem intracruzada, de 6 semanas de idade (Charles River) receberam injeção subcutânea de uma suspensão de células PC-3/Matrigel (1×10^6 células/camundongo). O tratamento foi iniciado no dia 15 após a injeção de células tumorais quando os tumores eram estabelecidos e continuado nos dias 22 e 29. As doses para as 3 injeções semanais eram 2, 0,2 e 0,02 mg/kg de peso corporal, fornecidas na forma de uma única injeção intravenosa em bolo via veia caudal lateral. Os grupos de tratamento incluíam o controle de solução salina (N=12), Phor18-LHRH (338613) (APC 338613 Lote # V09108X1) (0,002 (N=12), 0,02 (N=12), 0,2 (N=12) e 2 mg/kg (N=12),) e Phor18 = CLIP71 não conjugado (338983, Lote # V04004X1) (5 mg/kg (N=12), linha de base (N=12).

[000300] Um grupo de 12 camundongos carregando tumor foi sacrificado no dia 15 e serviu como o grupo de linha de base. Todos os camundongos foram submetidos à necropsia 35 e 36 dias após a

injeção de células tumorais. Os volumes dos tumores e os pesos corporais foram registrados duas vezes por semana durante o estudo, bem como foi realizado um exame veterinário geral dos camundongos.

[000301] Os tumores primários, o fígado, os rins, o pâncreas, o coração, os pulmões e o baço foram coletados, fixados em formalina e preparados para a avaliação histológica. Os pesos dos tumores foram medidos na necropsia, parte dos tumores foi congelada a -80°C para a determinação do ensaio de receptores de LH/CG e de LHRH.

[000302] Todos os grupos tolerados bem como injeções e todos os camundongos nos grupos de tratamento sobreviveram. Nenhum camundongo morreu como uma consequência da injeção.

[000303] Os volumes dos tumores diminuíram durante o tratamento com PHor18-LHRH (338613) em doses de 0,002, 0,02, 0,2 e 2 mg/kg. Para os camundongos tratados com o CLIP71 ou no controle de solução salina, era observado um crescimento do tumor. Os volumes dos tumores registrados após 22 dias após a injeção de células tumorais exibiam reduções ($p < 0,001$) comparados com o controle de solução salina e o CLIP71 em concentrações de Phor18-LHRH (338613) tão baixas quanto 0,002 mg/kg de peso corporal. Os pesos dos tumores eram significativamente reduzidos comparados com os grupos de tratamento com controle de solução salina e CLIP-71 (0,001 em todos os grupos tratados com Phor 18-LHRH (338613)).

[000304] É sabido que os xenoenxertos de PC-3 causam perda de peso em camundongos nus. Nos camundongos tratados com Phor18-LHRH (338613), os volumes dos tumores diminuíram nos grupos tratados com 0,002, 0,02, 0,2 e 2 mg/kg de Phor18-LHRH (338613) comparados com as injeções com controle de solução salina e CLIP71. Os pesos médios dos tumores na necropsia eram significativamente reduzidos comparados com o controle de solução salina e o CLIP71 ($p < 0,001$). Os camundongos nos grupos de controle

estavam caquéticos e sofreram uma perda de peso de mais de 10 g comparados com os camundongos tratados.

[000305] Phor18-LHRH (338613) é eficiente na interrupção do crescimento de tumor em xenoenxertos PC-3 e na prevenção de perda de peso grave devido ao fardo do tumor. Phor18-LHRH (338613) não conjugada é ineficiente.

[000306] Em suma, os estudos anteriores indicam que o peptídeo KFAKFAKKFAKFAKKFAKQHWSYGLRPG (Phor18-LHRH (338613)) é eficiente *in vivo* na destruição de xenoenxertos de câncer de mama, de câncer de ovário e de câncer de próstata. Phor 18-LHRH (338613) causa necrose de tumor em camundongos tratados, com a necrose sendo evidente tão longo quanto 1 hora pós-injeção. Phor 18-LHRH (338613) é eficiente como um único regime de tratamento semanal induzindo a necrose e causando a redução do peso do tumor. Na forma de um regime múltiplo semanal a erradicação de tumores é mais evidente incluindo a destruição de células tumorais residuais. Phor 18-LHRH (338613) causa redução nos níveis de receptores de LHRH após o tratamento, coerente com a destruição das células-alvo.

REIVINDICAÇÕES

1. Construção de fusão, caracterizada pelo fato de que apresenta um primeiro domínio e um segundo domínio, em que o referido primeiro domínio consiste em uma sequência de 15 a 20 aminoácidos com uma sequência de aminoácidos selecionada dentre KFAKFAKKFAKFAKK (SEQ ID NO: 1), KFAKFAKKFAKFAKKF (SEQ ID NO: 2), KFAKFAKKFAKFAKKFA (SEQ ID NO: 3), KFAKFAKKFAKFAKKFAK (SEQ ID NO: 4), KFAKFAKKFAKFAKKFAKF (SEQ ID NO: 5) e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA (SEQ ID NO: 6) ou uma sequência de 15 a 20 aminoácidos com uma sequência de aminoácidos selecionada dentre KFAKFAKKFAKFAKK (SEQ ID NO: 1), KFAKFAKKFAKFAKKF (SEQ ID NO: 2), KFAKFAKKFAKFAKKFA (SEQ ID NO: 3), KFAKFAKKFAKFAKKFAK (SEQ ID NO: 4), KFAKFAKKFAKFAKKFAKF (SEQ ID NO: 5) e KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA (SEQ ID NO: 6), tendo um dentre os resíduos K substituído por qualquer um dentre um resíduo F ou L, um dentre os resíduos de F substituído por qualquer um dentre um resíduo K, A ou L, ou um dentre os resíduos de A substituído por qualquer um dentre um resíduo K, F ou L; e em que o referido segundo domínio compreende uma porção de ligação.

2. Construção de fusão, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido primeiro domínio consiste em uma sequência de 15 ou 18 aminoácidos que inclui um peptídeo selecionado dentre KFAKFAKKFAKFAKK (SEQ ID NO: 1), KFAKFAKKFAKFAKKF (SEQ ID NO: 2), KFAKFAKKFAKFAKKFA (SEQ ID NO: 3), e KFAKFAKKFAKFAKKFAK (SEQ ID NO: 4) ou uma sequência de 15 ou 18 aminoácidos que inclui um peptídeo selecionado dentre KFAKFAKKFAKFAKK (SEQ ID NO: 1), KFAKFAKKFAKFAKKF (SEQ ID NO: 2), KFAKFAKKFAKFAKKFA (SEQ ID NO: 3), e KFAKFAKKFAKFAKKFAK (SEQ ID NO: 4), tendo

um dos resíduos K substituído por qualquer um resíduo F ou L, um dos resíduos F substituído por qualquer um resíduo K, A ou L ou um dos resíduos A substituído por qualquer um resíduo K, F ou L.

3. Construção de fusão, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a referida porção de ligação se liga a (a) um receptor, ligante ou antígeno; ou (b) um receptor, ligante ou antígeno expresso em uma célula.

4. Construção de fusão, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o referido ligante compreende um agonista ou antagonista do receptor.

5. Construção de fusão, de acordo com a reivindicação 3 (b), caracterizada pelo fato de que a referida célula é uma célula hiperproliferativa.

6. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a referida porção de ligação compreende (a) um ligante, receptor ou um anticorpo ou fragmento de anticorpo, ou (b) um peptídeo, polipeptídeo, proteína, ácido nucleico ou carboidrato.

7. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a referida porção de ligação é um hormônio, um receptor de hormônio ou um agente que se liga a um hormônio ou a um receptor hormonal.

8. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o referido segundo domínio consiste em uma sequência de aminoácidos de 1 a 10, 10 a 20, 15 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, ou 90 a 100 aminoácidos.

9. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o referido segundo domínio consiste em uma sequência de aminoácidos estabelecida

como: (a) SYAVALSAQAALARR (SEQ ID NO: 8), ou (b) QHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 9).

10. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que o referido primeiro domínio está posicionado no NH2-terminal em relação ao referido segundo domínio ou o referido segundo domínio está posicionado no NH2-terminal em relação ao referido primeiro domínio.

11. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que o referido primeiro domínio ou o referido segundo domínio possui um ou mais D-aminoácidos.

12. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que o referido primeiro domínio forma uma alfa-hélice anfipática.

13. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que os referidos primeiro e segundo domínios são unidos por (a) uma ligação covalente; ou (b) sequência peptídica com 1 a 25 resíduos de aminoácidos ou (c) uma cadeia linear de carbono.

14. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizada pelo fato de que a referida construção de fusão tem uma razão IC50/(HA50, atividade hemolítica) inferior a 0,02, 0,01 ou 0,005.

15. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pelo fato de que a referida porção de ligação compreende o hormônio liberador de gonadotropina I, hormônio liberador de gonadotropina II, hormônio liberador de hormônio luteinizante de lamprey III, cadeia beta do hormônio luteinizante, hormônio luteinizante (LH), gonadotrofina coriônica (CG), subunidade beta de gonadotrofina coriônica (β - ou beta-CG), hormônio

estimulador de melanócitos, estradiol, dietilestereol, dopamina, somatostatina, hormônio folículo-estimulante (FSH), glicocorticoide, estrogênio, testosterona e androstenediona, desidrotestosterona, diidrotestosterona, uma progesterona ou um androgênio.

16. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que o referido primeiro domínio consiste em um peptídeo, KFAKFAKKFAKFAKKFAK (SEQ ID NO: 4), ou um peptídeo, KFAKFAKKFAKFAKK (SEQ ID NO: 1), tendo um dos resíduos K substituído por qualquer um dos resíduos F ou L, um dos resíduos F substituído por qualquer um dos resíduos K, A ou L ou um dos resíduos A substituído por qualquer um dos resíduos K, F ou L.

17. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14 ou 16, caracterizada pelo fato de que o referido primeiro domínio consiste em um peptídeo, KFAKFAKKFAKFAKKFAK (SEQ ID NO: 4), ou um peptídeo, KFAKFAKKFAKFAKK (SEQ ID NO: 1).

18. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, 16 ou 17, caracterizada pelo fato de que o referido segundo domínio compreende o hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH), ou um fragmento de ligação do mesmo.

19. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, 16 ou 17, caracterizada pelo fato de que o referido primeiro domínio consiste em um peptídeo, KFAKFAKKFAKFAKKFAK (SEQ ID NO: 4), e em que o referido segundo domínio consiste em QHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 9).

20. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14 ou 16 a 19, caracterizada pelo fato de que a referida construção de fusão consiste em KFAKFAKKFAKFAK KFAKQHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 15).

21. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato de que o referido segundo domínio consiste em uma subunidade beta de gonadotrofina coriônica (βCG).

22. Construção de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que o referido primeiro domínio consiste em um peptídeo, KFAKFAKKFA KFAKKFAK (SEQ ID NO: 4), e em que o referido segundo domínio consiste em SYAVALSAQAALARR (SEQ ID NO: 8).

23. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que consiste na construção de fusão, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, e um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

24. Processo para reduzir ou inibir seletivamente a proliferação de uma célula que expressa um receptor, ligante ou antígeno, caracterizado pelo fato de que

(a) fornece uma célula que expressa o receptor, ligante ou antígeno,

(b) contata a célula com a construção de fusão, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22,

em que o motivo de ligação do referido peptídeo se liga ao receptor, ligante ou antígeno expresso pela célula, reduzindo ou inibindo assim a proliferação da referida célula,

desde que um método para tratamento do corpo humano ou animal por cirurgia ou terapia e métodos de diagnóstico praticados no corpo humano ou animal sejam excluídos.

25. Processo, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida célula é uma célula hiperproliferativa.

26. Processo, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida célula é uma célula neoplásica,

tumoral, cancerosa ou maligna.

27. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, caracterizado pelo fato de que o receptor, ligante ou antígeno expresso na referida célula é selecionado dentre (a) um hormônio ou um receptor de hormônio; (b) um hormônio esteroide sexual ou gonadal ou um receptor de hormônio esteroide sexual ou gonadal, ou (c) um receptor que se liga ao hormônio liberador de gonadotropina I, hormônio liberador de gonadotropina II, hormônio liberador de hormônio luteinizante de lamprey III, cadeia beta do hormônio luteinizante, hormônio luteinizante, gonadotrofina coriônica, subunidade beta de gonadotrofina coriônica, hormônio estimulador de melanócitos, estradiol, dietilstilbesterol, dopamina, somatostatina, hormônio folículo-estimulante (FSH), glicocorticoide, estrogênio, testosterona, androstenediona, diidrotestosterona, progesterona, andrógeno, fator de crescimento epidérmico (EGF), hormônio do crescimento (GH), Her2/neu, vitamina H, folato, transferrina, hormônio estimulador da tireoide (TSH), endotelina, bombesina, peptídeo intestinal vasoativo, lactoferrina, uma integrina, fator de crescimento nervoso, CD-8, CD-33, CD19, CD20, CD40, ROR1, IGF-1, antígeno carcinoembrionário (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno específico da próstata (PSA), antígeno de membrana específico da próstata (PSAM), CA 125 (câncer epitelial residual do ovário), receptor solúvel de Interleucina-2 (IL-2), RAGE-1, tirosinase, MAGE-1, MAGE-2, NY-ESO-1, MelanA/MART-1, glicoproteína (gp) 75, gp100, beta-catenina, PRAME, MUM-1, ZFP161, Ubiquitin-1, HOX-B6, YB-1, Osteonectina, ILF3, ácido fólico ou seu derivado, um membro da família do fator de necrose tumoral (TNF), TNF-alfa, TNF-beta (linfoxina, LT), TRAIL, Fas, LIGHT, 41 BB, fator de crescimento transformador alfa, fator de crescimento transformador beta, insulina, ceruloplasmina, HIV-tat, um peptídeo ou proteína que apresenta um motivo de sequência RGD, um

monossacarídeo, dissacarídeo, oligossacarídeo, ácido siálico, galactose, manose, fucose e ácido acetilneuramínico.

28. Uso da construção de fusão, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que é no preparo de uma composição para:

(a) tratamento de um distúrbio hiperproliferativo em um indivíduo;

(b) redução ou inibição da metástase de uma neoplasia, tumor, câncer ou malignidade para outros locais ou formação ou estabelecimento de neoplasia, tumor, câncer ou malignidade metastásica em outros locais distais de uma neoplasia, tumor, câncer ou malignidade primária em um indivíduo;

(c) redução da fertilidade de um animal;

(d) redução ou tratamento da endometriose de um animal;

(e) redução ou tratamento de hiperplasia de próstata benigna de um animal; ou

(f) redução ou tratamento de um mioma ou um pólipó de um animal.

FIG. 1

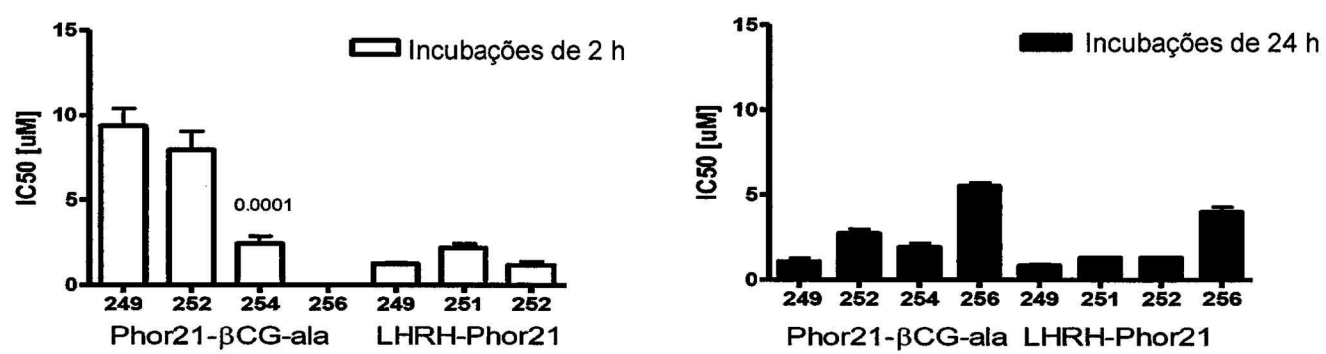


FIG. 2

Comparação de Dobradiça/Espaçadores para conjugados de β CG-ala

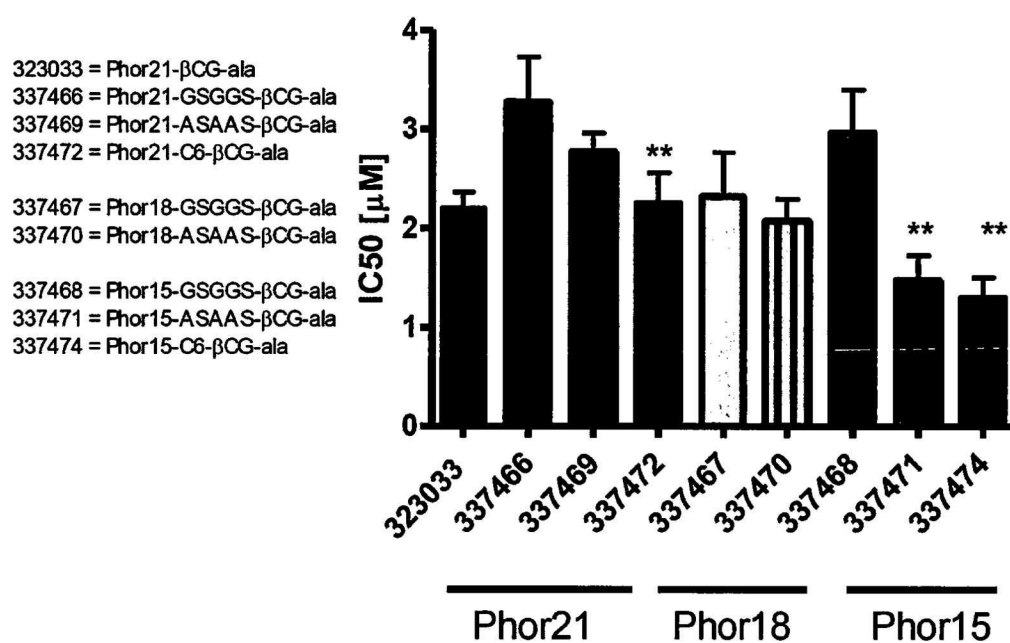


FIG. 3

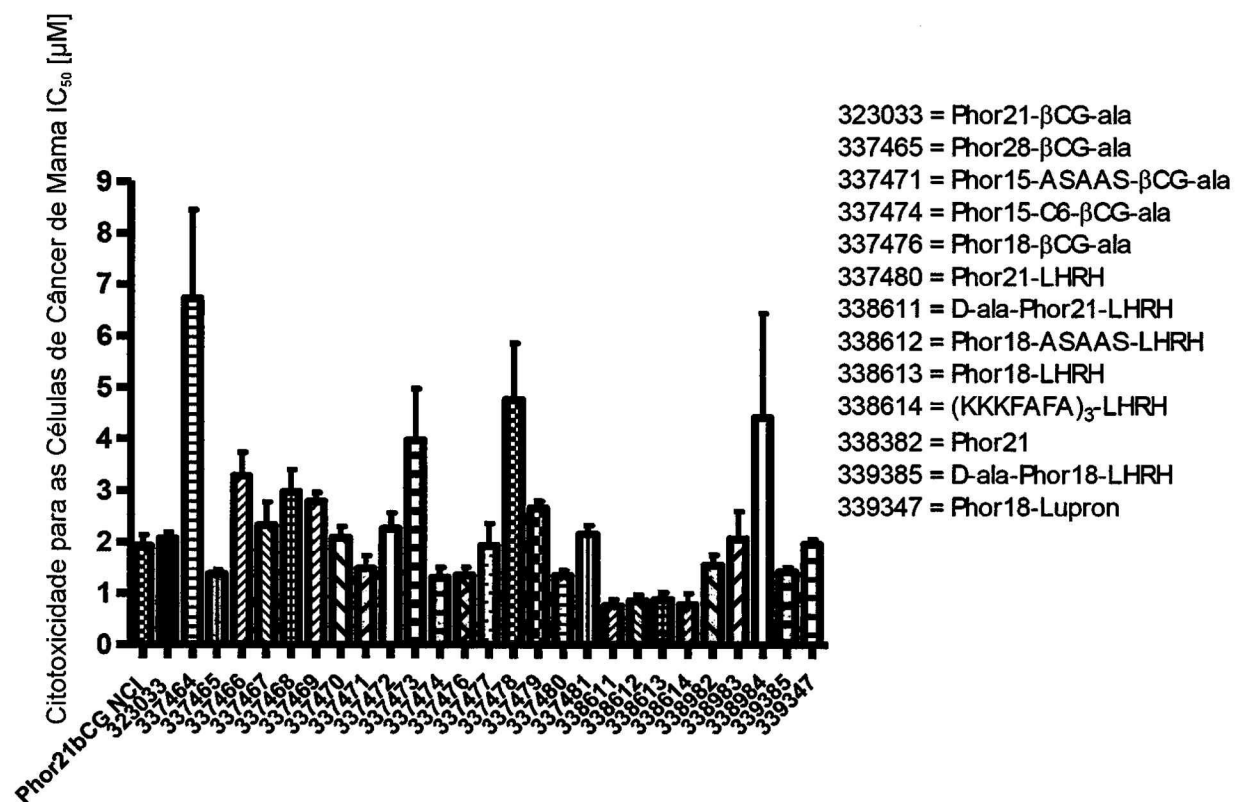
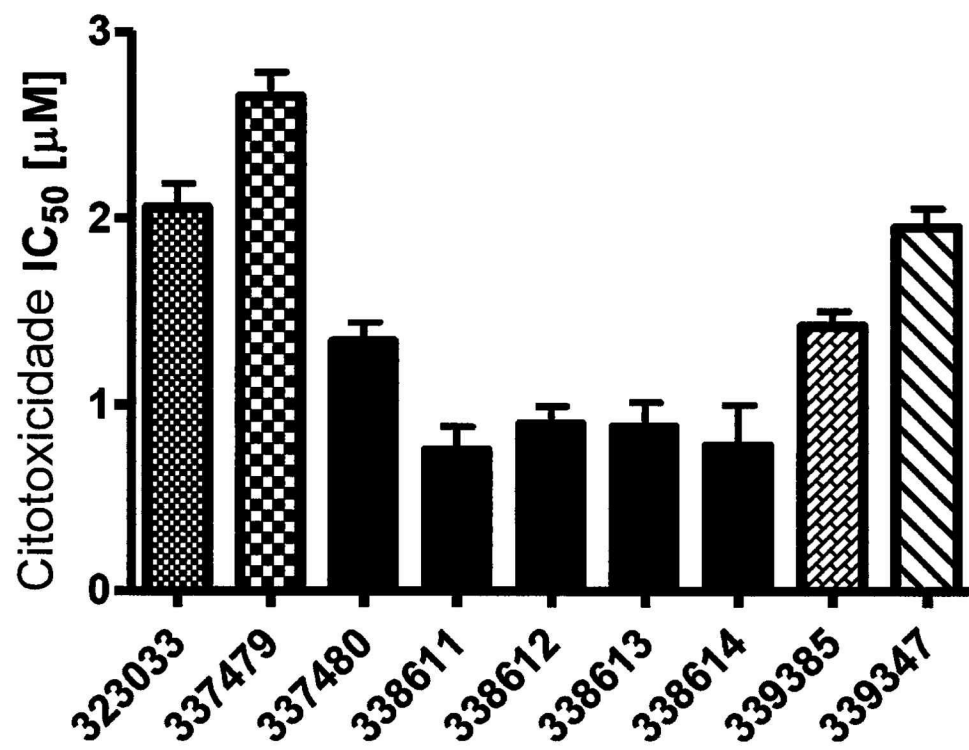


FIG. 4



Atividade Hemolítica Aguda

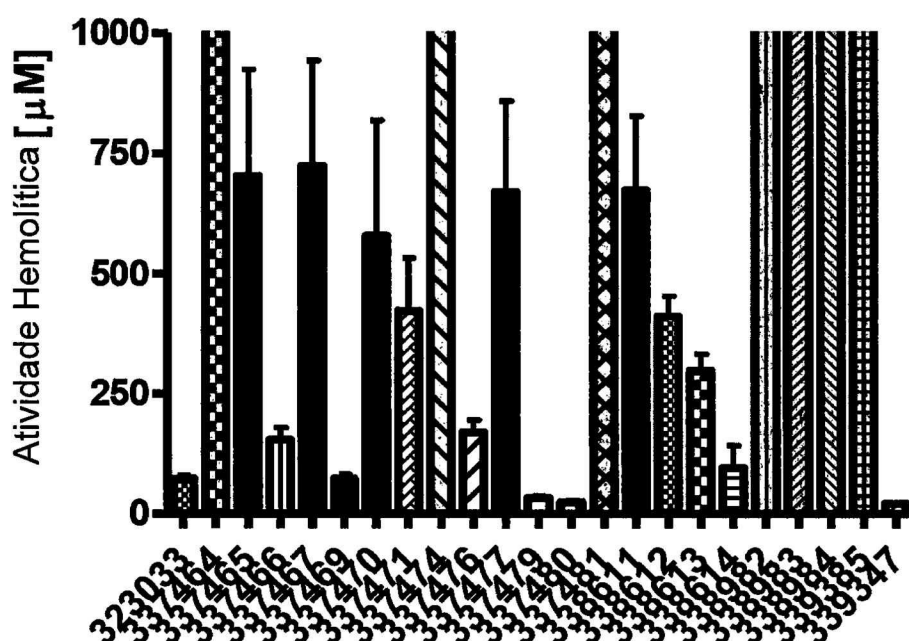


FIG. 6

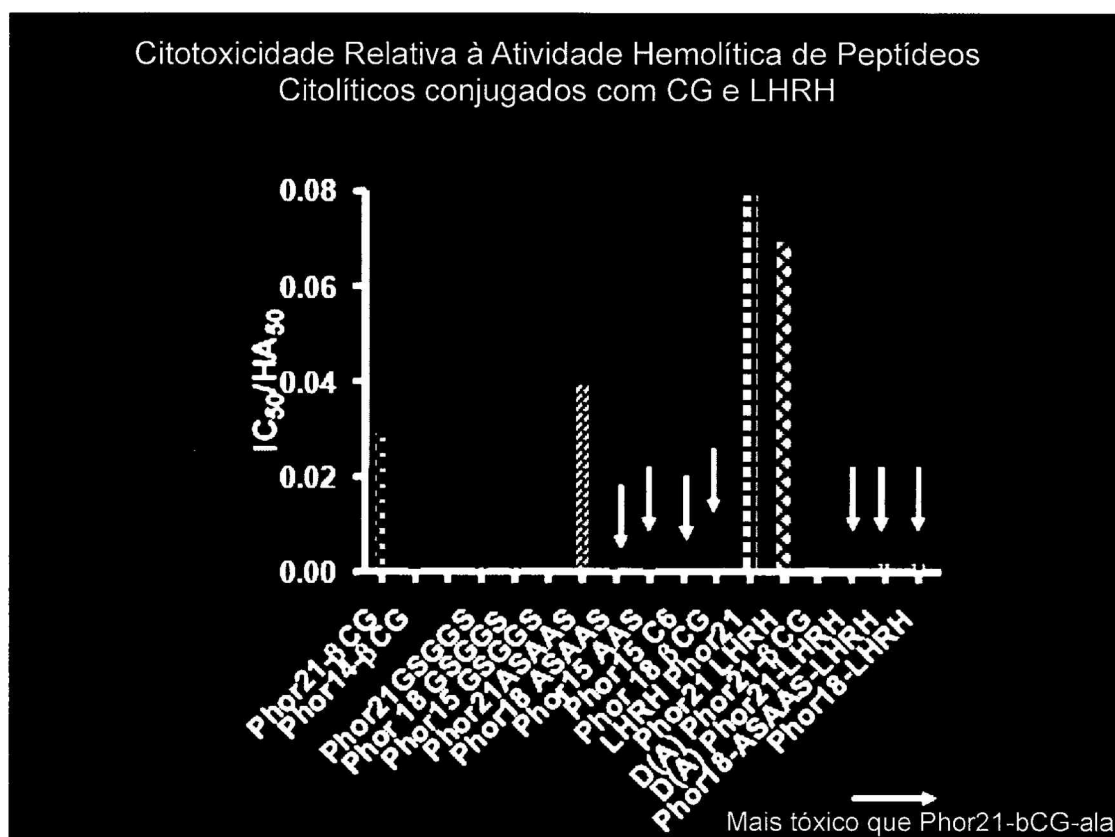
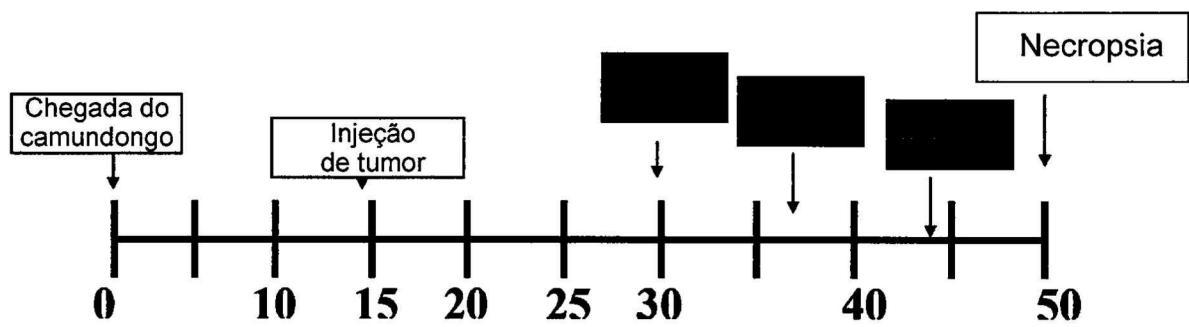


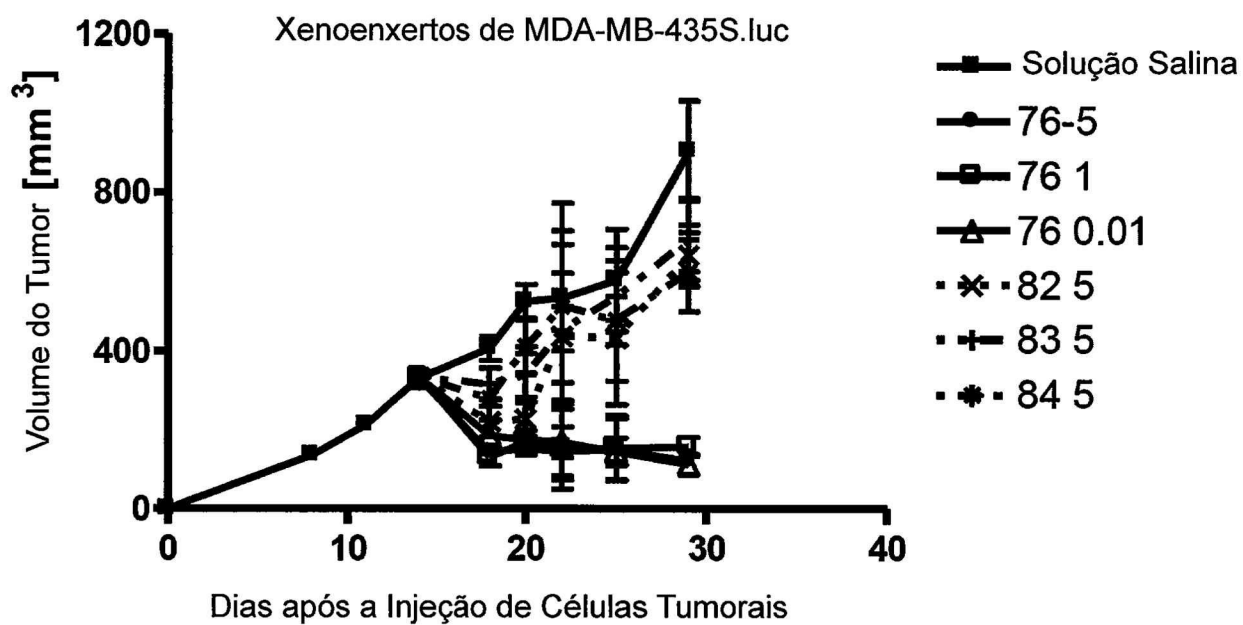
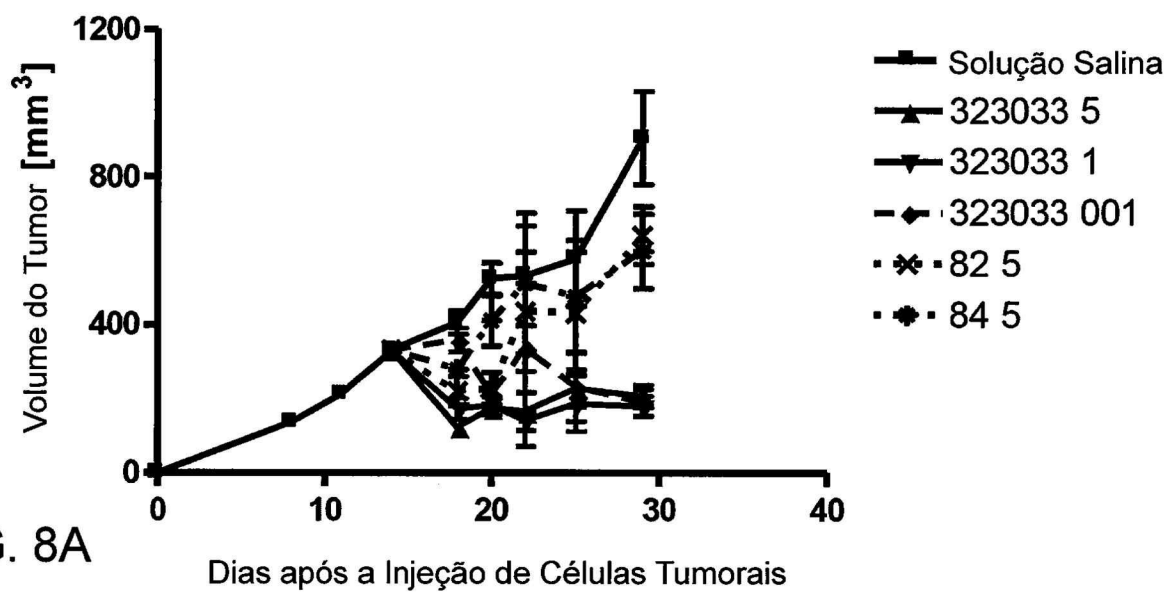
FIG. 7

Linha de tempo in vivo para testar a eficácia do peptídeo
inativo Phor21-CG-ala, Phor18-bCG-ala,
Phor21, Phor18 e ML-bCG-ala



I) Volume de Tumor Durante o Estudo de Eficácia

Xenoinxertos de MDA-MB-435S.luc



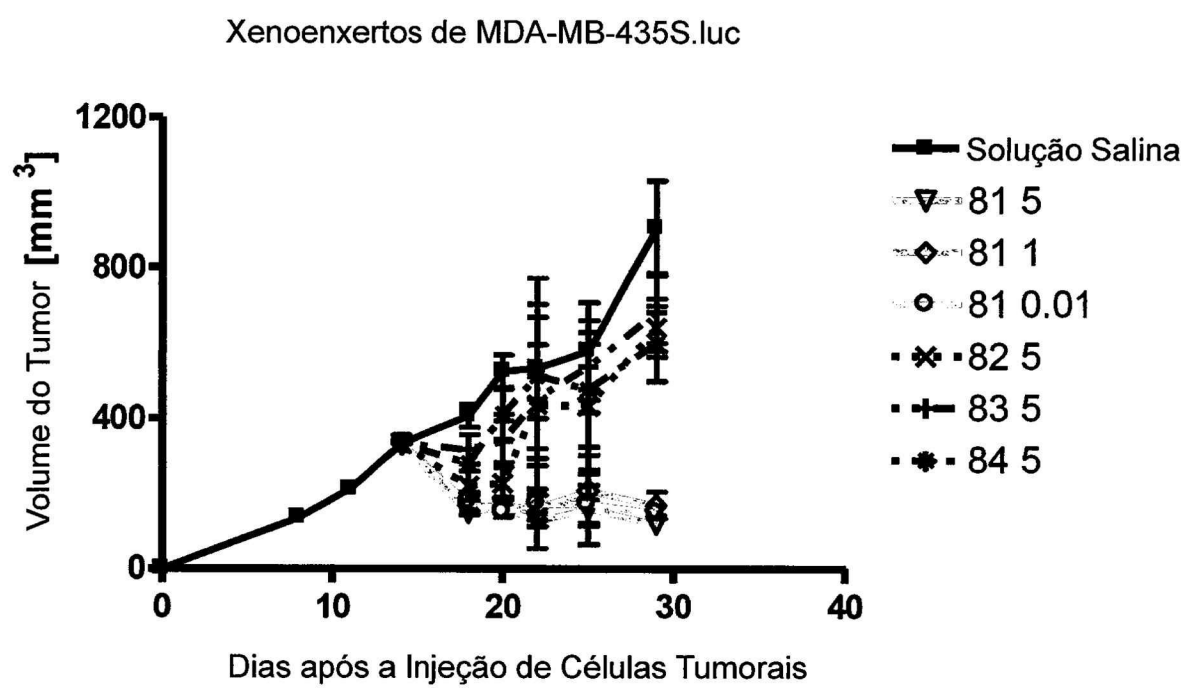


FIG. 8C

FIG. 8D II) Volume do Tumor, Peso, Números de Células Tumoraes, Condições do Tumor e Pesos Corporais na Necrópsia

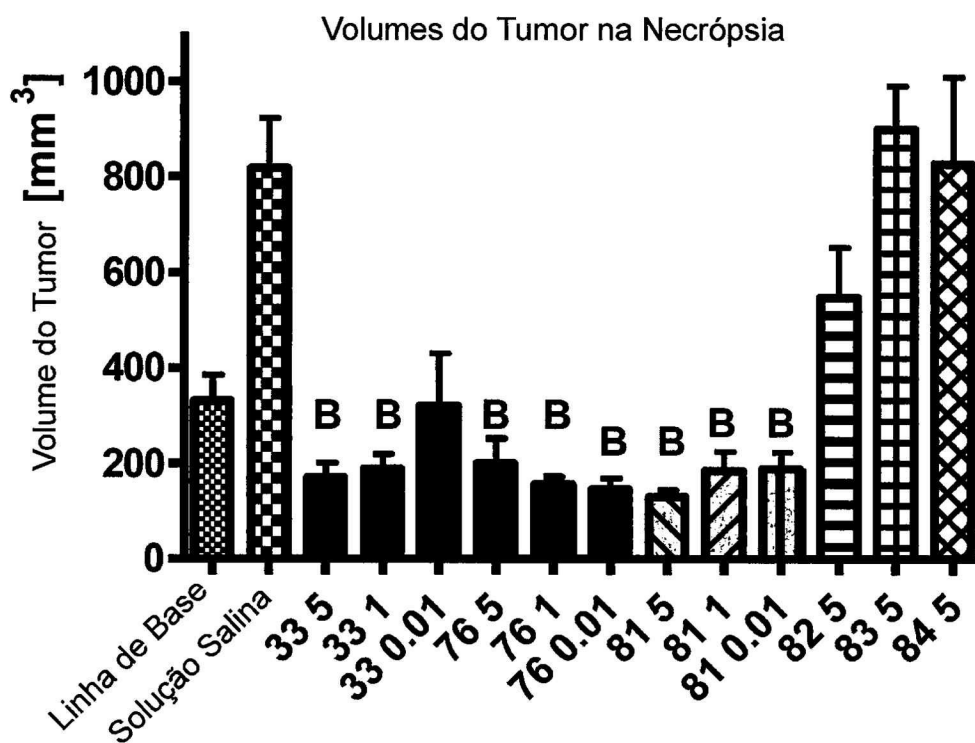


FIG. 8E

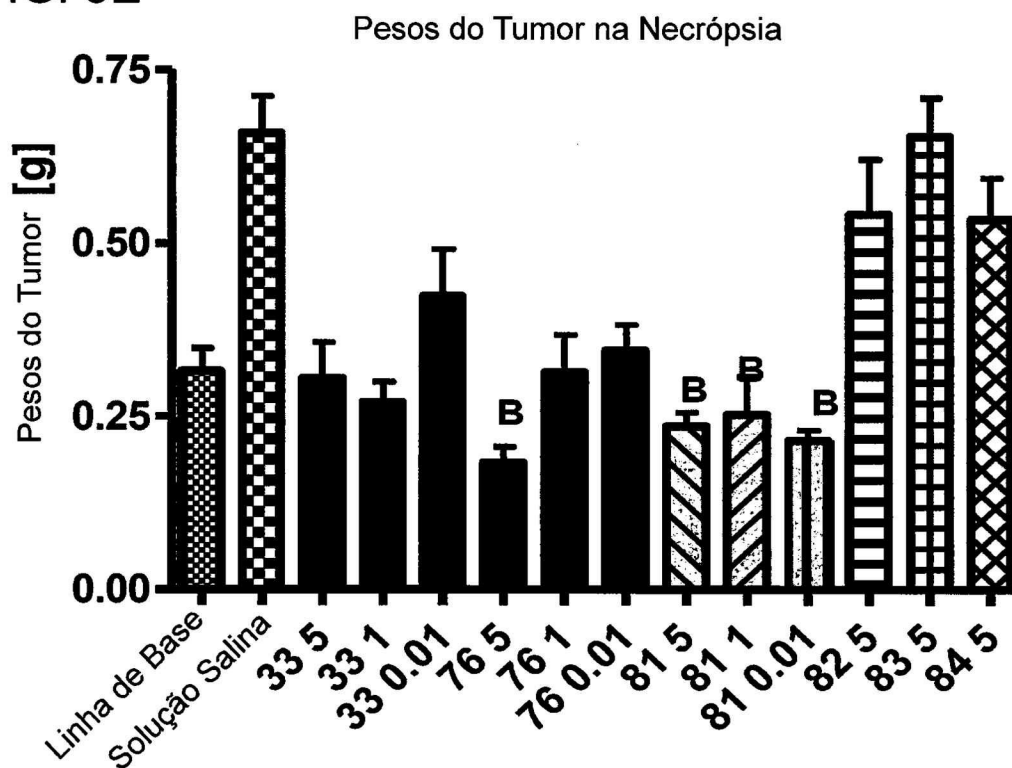


FIG. 8F

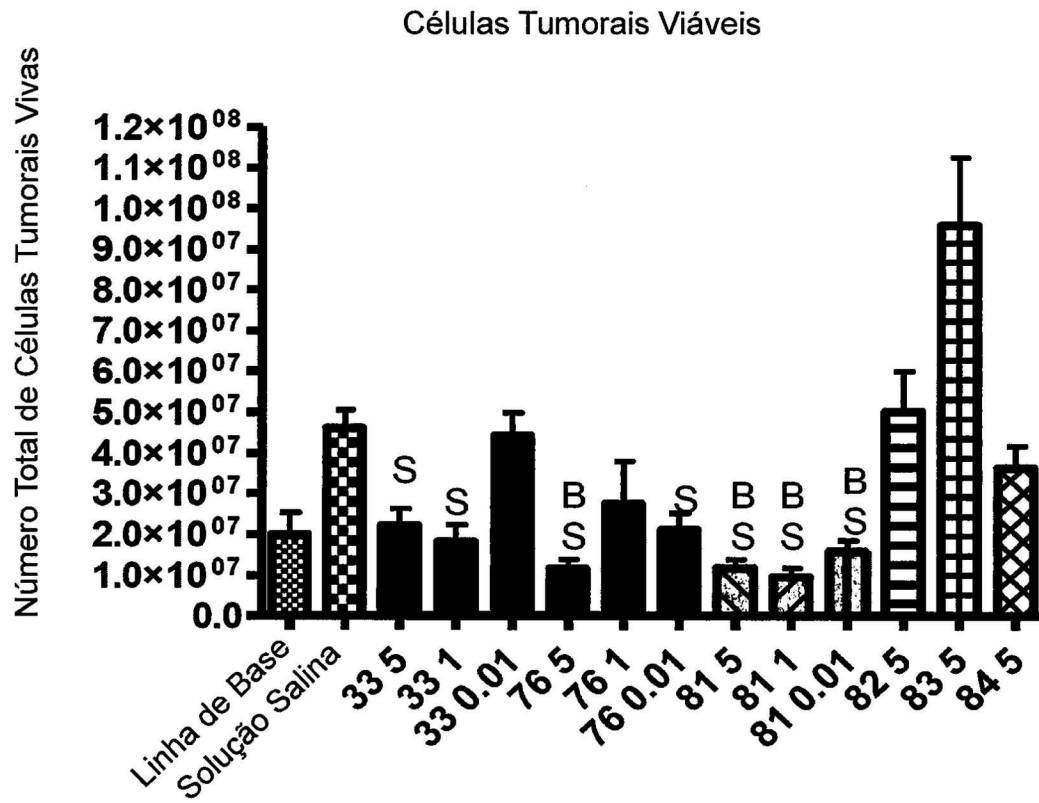


FIG. 8G

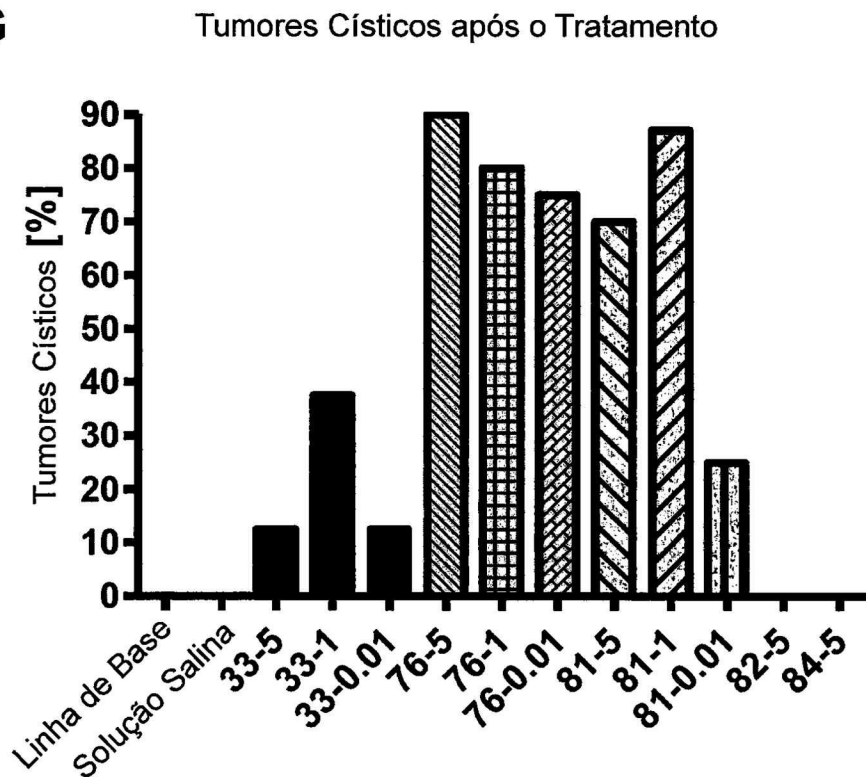


FIG. 8H

Peso do tumor comparado com a Linha de Base

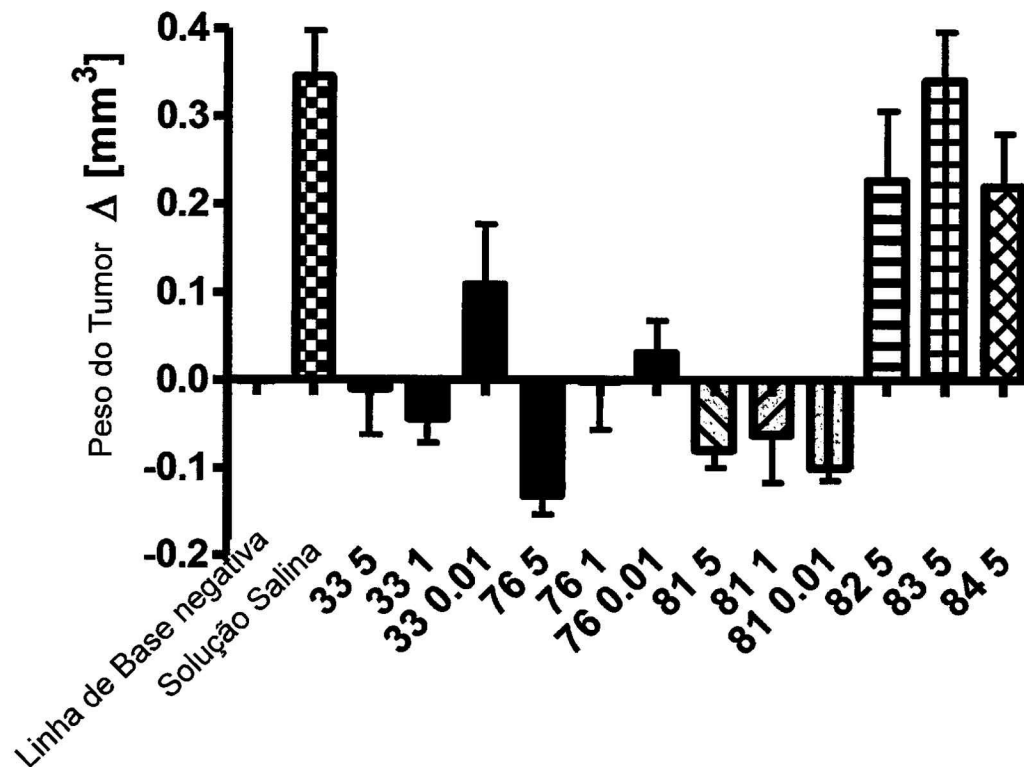


FIG. 8I

Células Tumorais Viáveis Comparadas com a Linha de Base

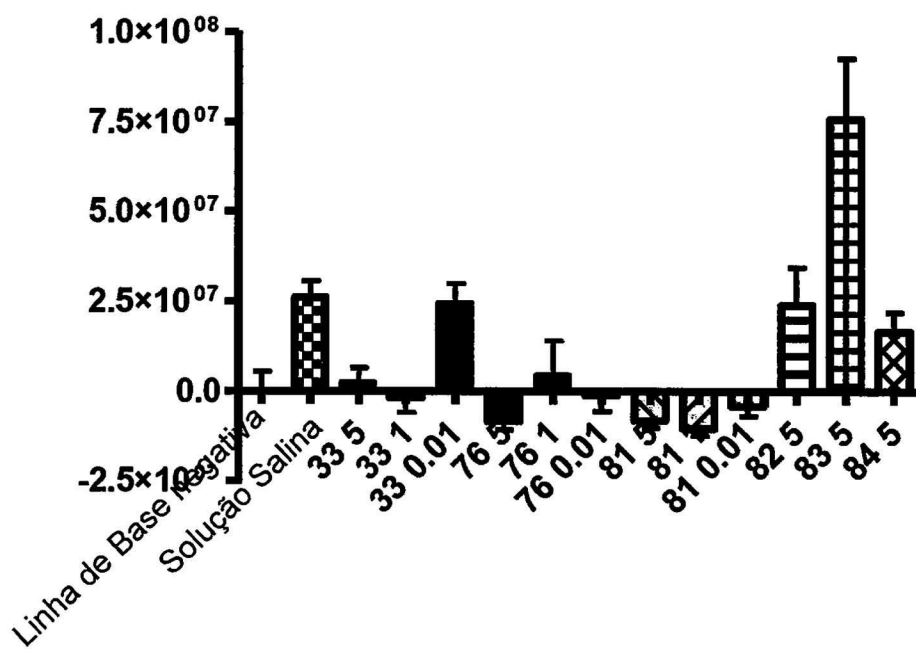


FIG. 8J

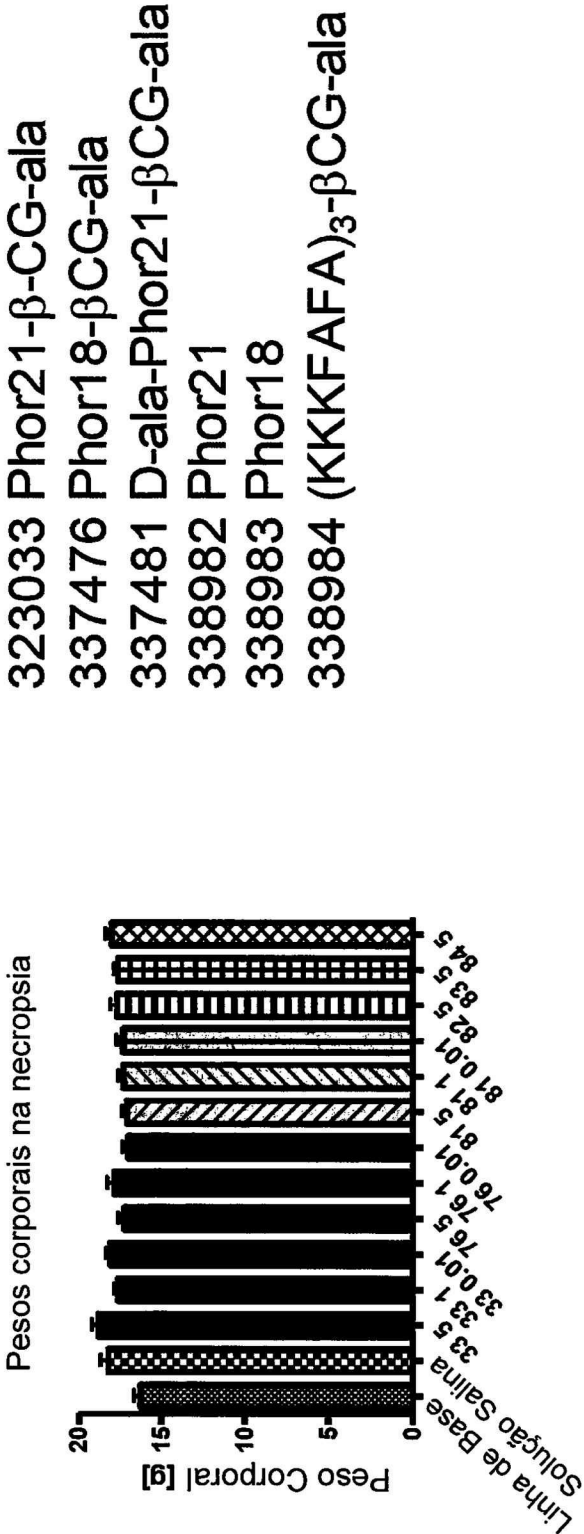


FIG. 9A

Estudo da Eficácia do Volume de Tumor E 4

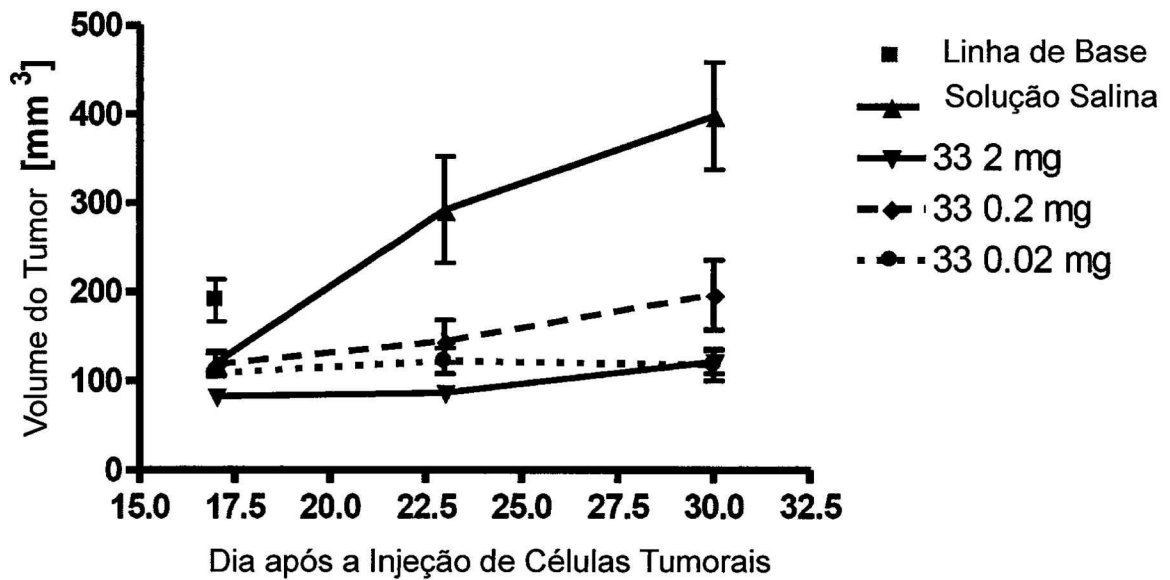
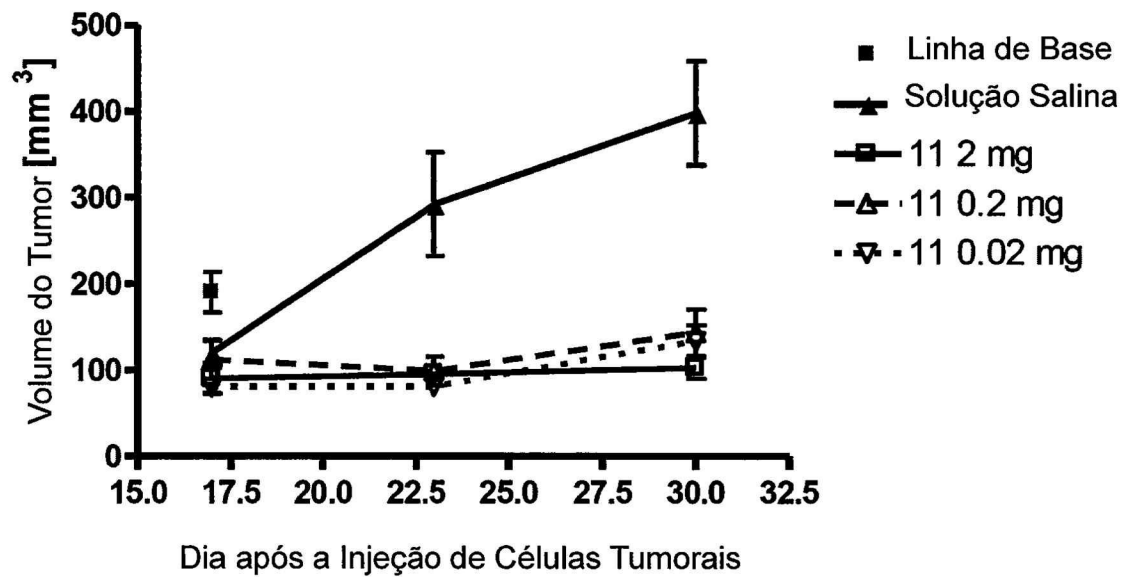


FIG. 9B



15/22

FIG. 9C

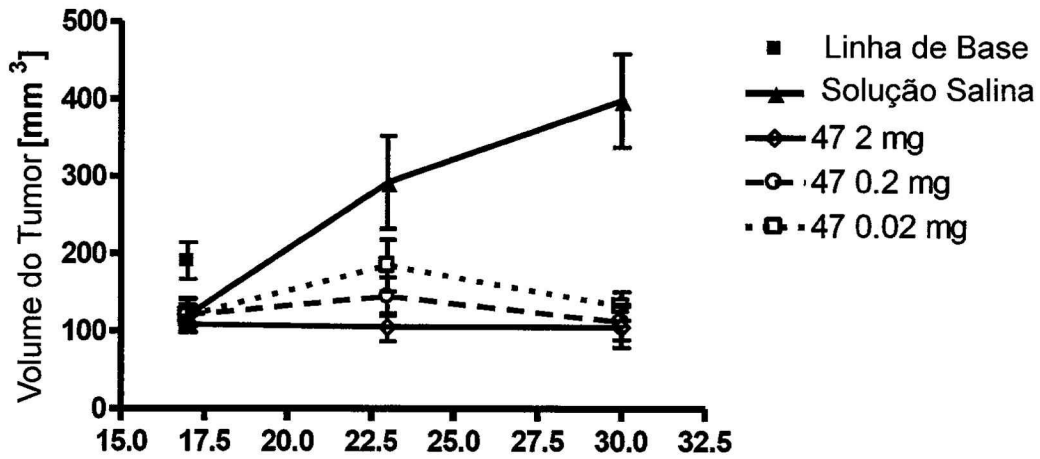


FIG. 9D Dias após a Injeção de Células Tumorais

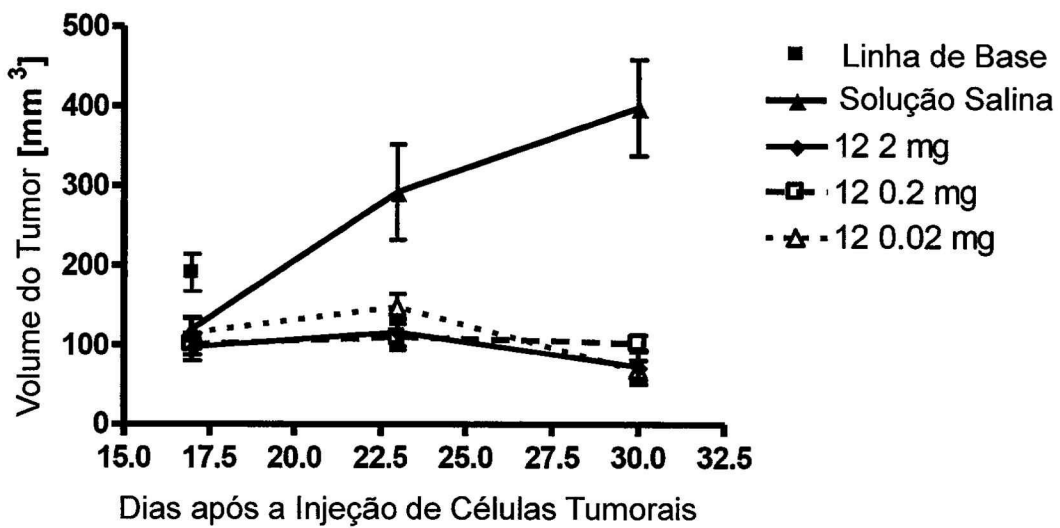


FIG. 9E

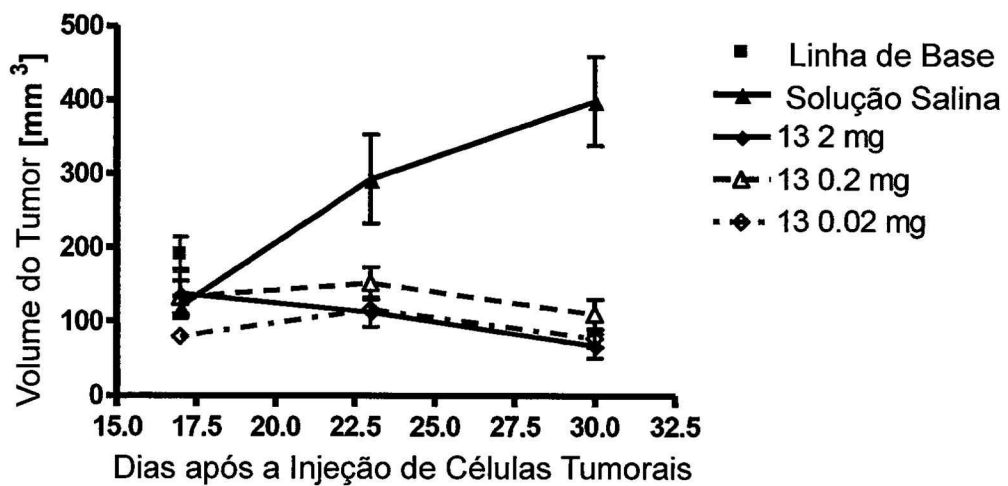


FIG. 9F

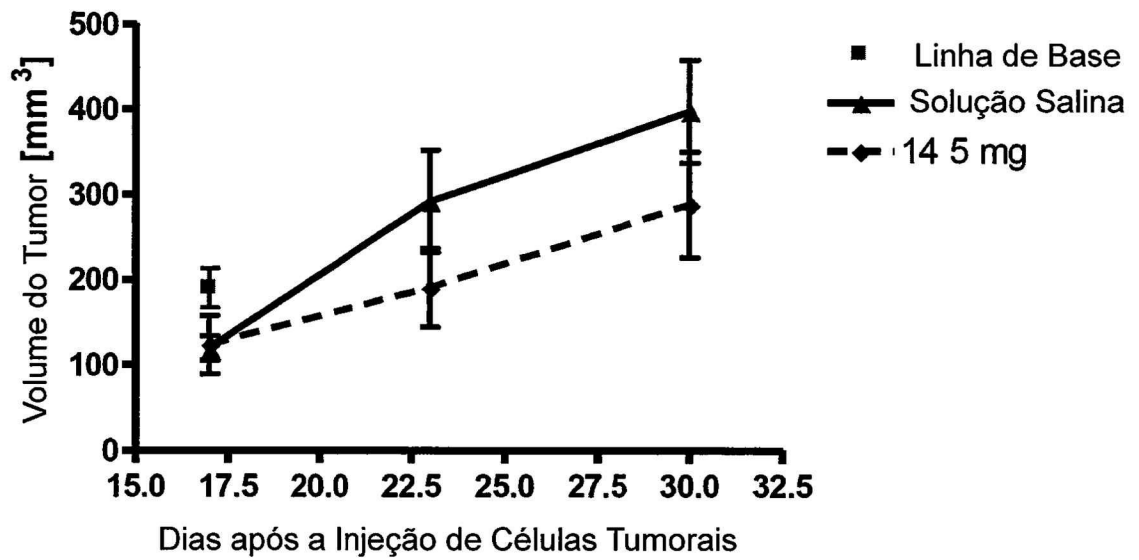


FIG. 9G

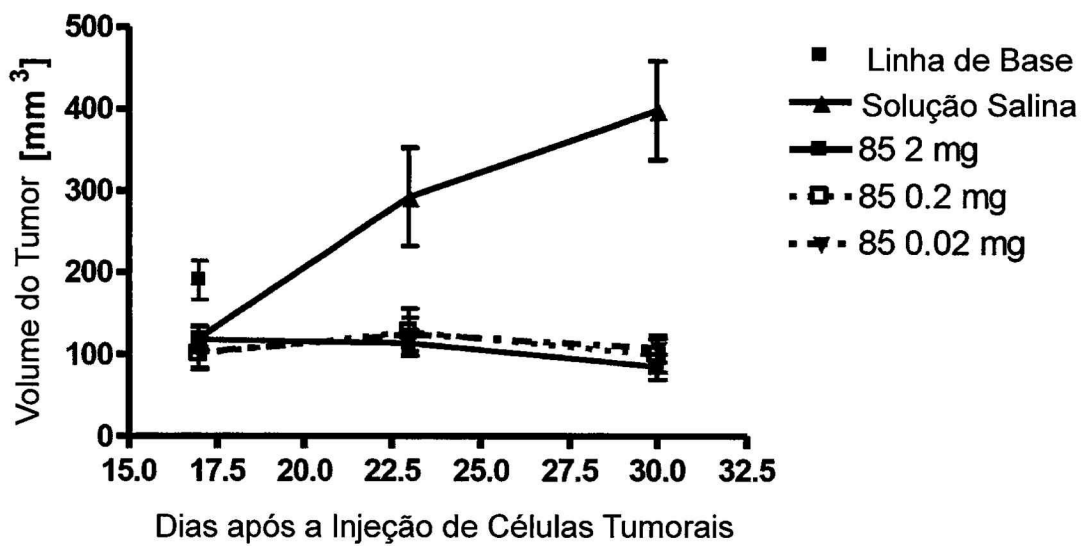
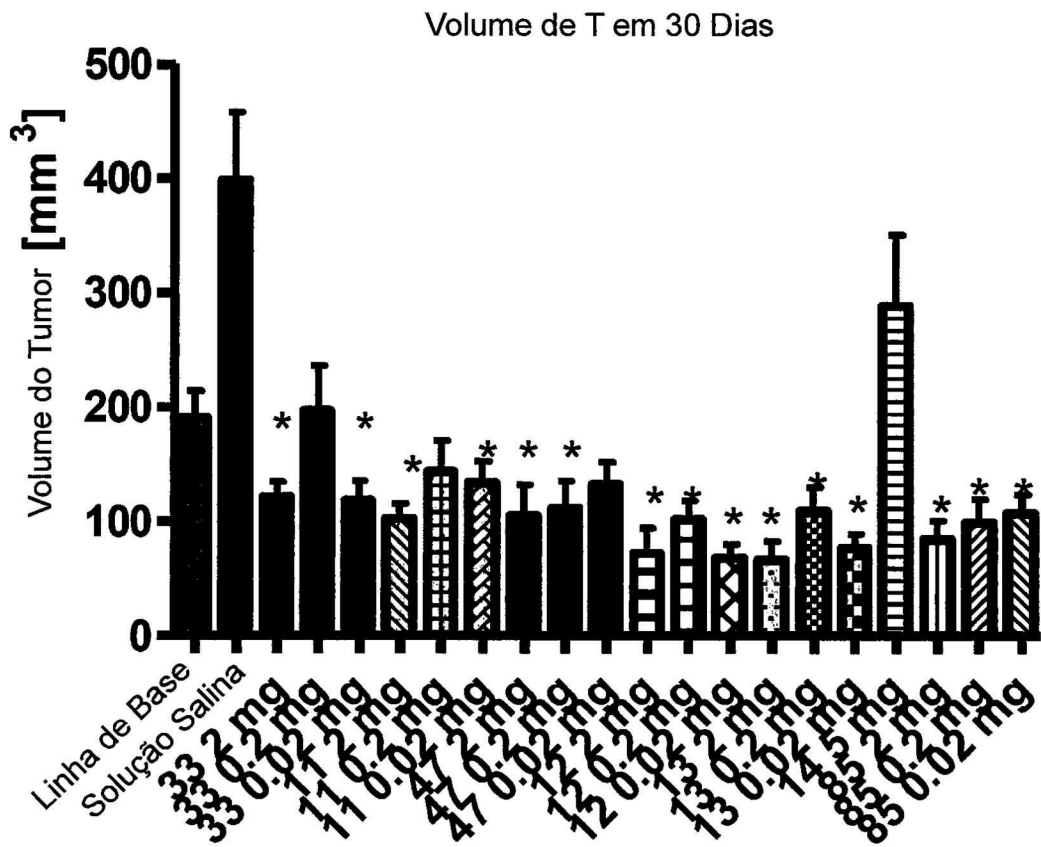


FIG. 9H



p < 0,01 comparado com a linha de base

FIG. 10A Estudo de Eficácia – Peptídeos Citolíticos conjugados com LHRH

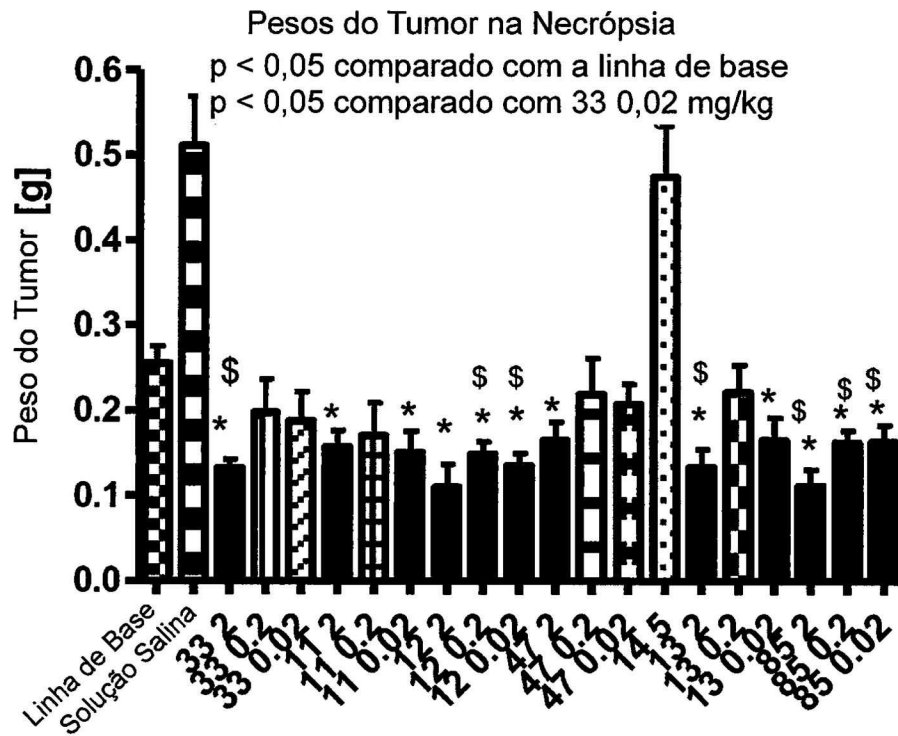


FIG. 10B

Alterações nos Pesos de Tumor Comparados ao da Linha de Base

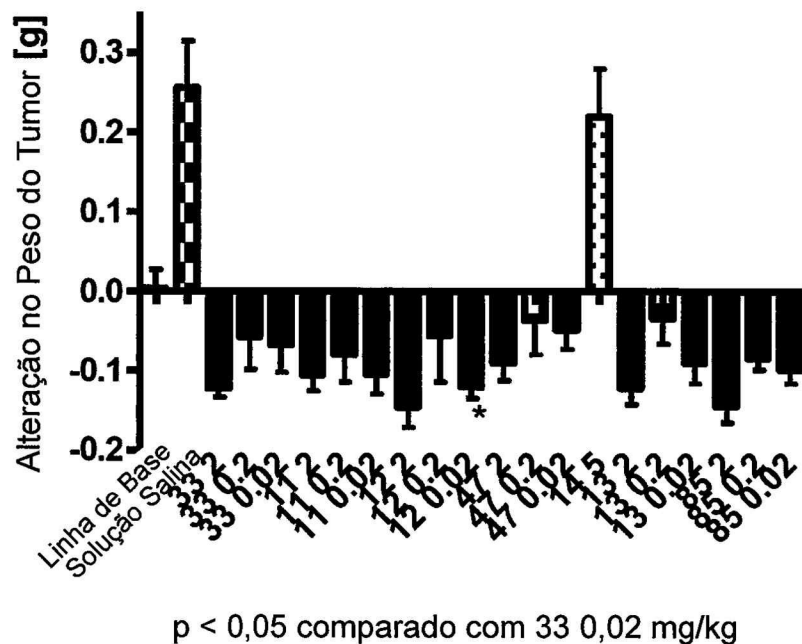


FIG. 10C

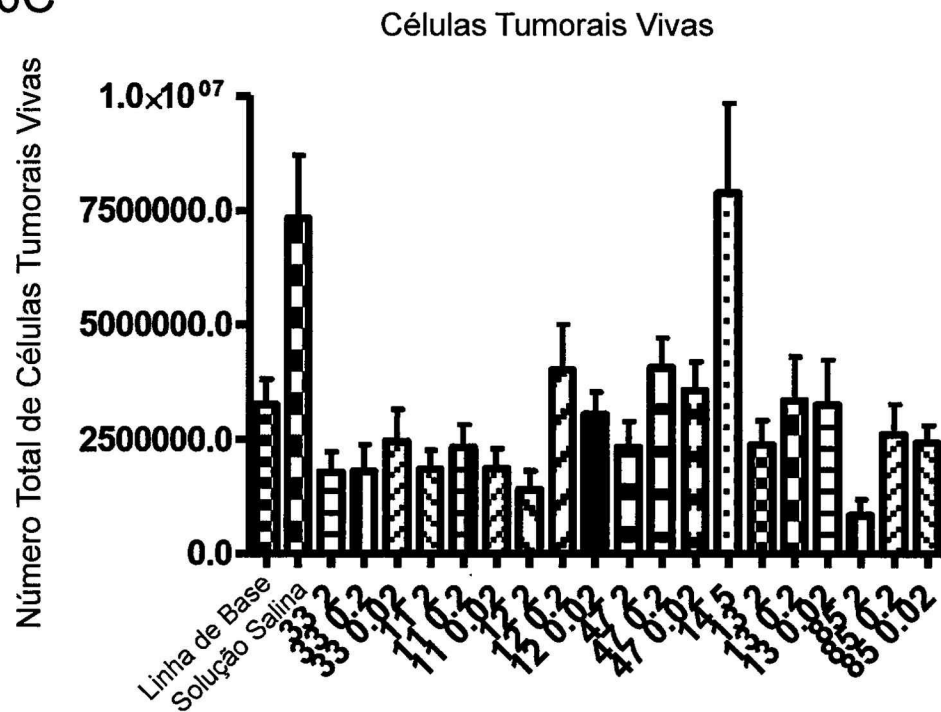
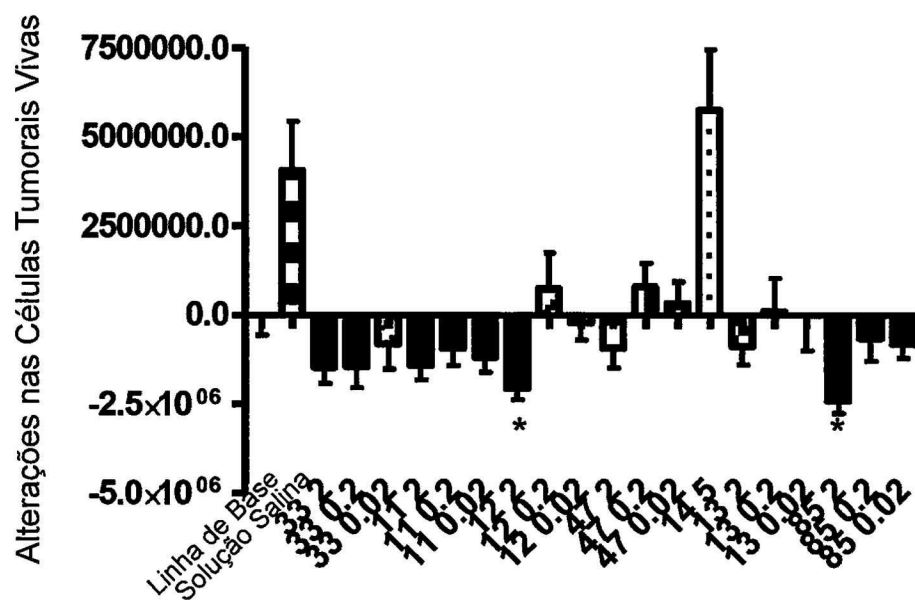


FIG. 10D

Alterações nas Células Tumorais Vivas Comparadas com a Linha de Base



p < 0,04 comparado com 33 2 mg/kg

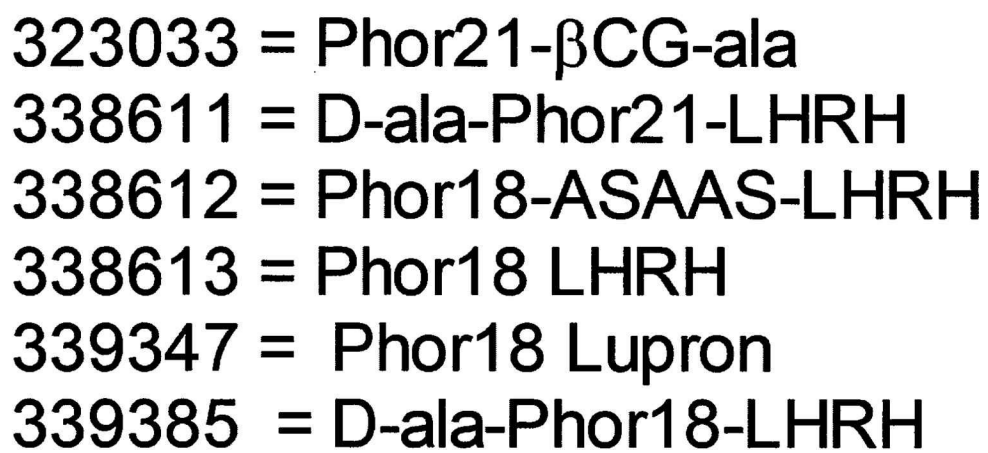
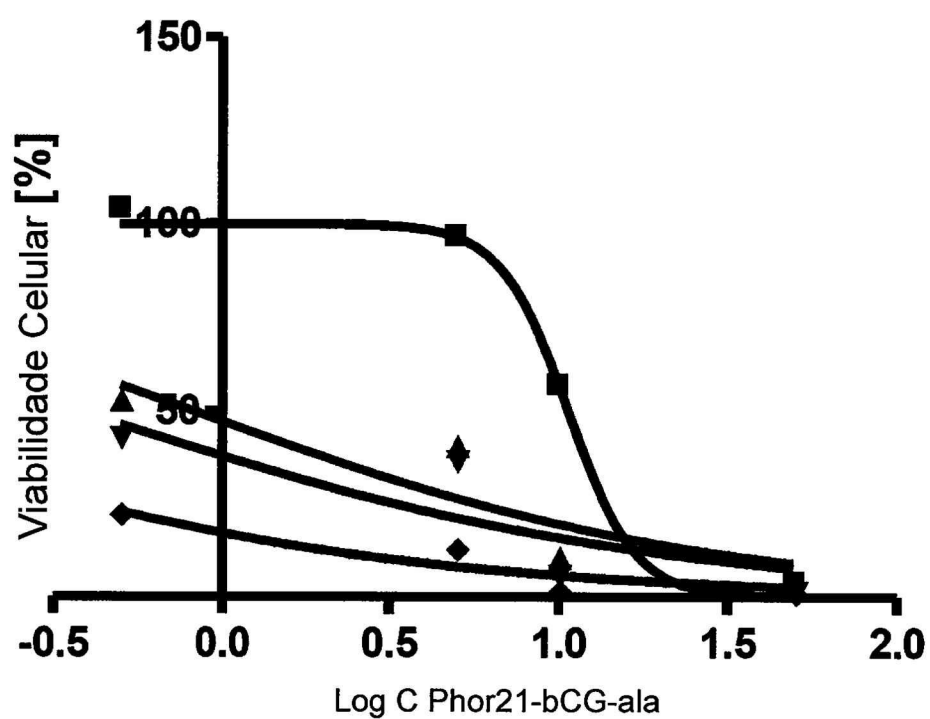


FIG. 11



IC₅₀ Phor21- β CG-ala

- 0 $\mu\text{g/mL}$ de Doxorubicina **10.67 μM**
- ▲ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de Doxorubicina **0.87 μM**
- ▼ 2 $\mu\text{g/mL}$ de Doxorubicina **0.37 μM**
- ◆ 10 $\mu\text{g/mL}$ de Doxorubicina **0.05 μM**

FIG. 12

Toxicidade de conjugados de Phor21 às células CHO e TM4 em comparação às células MDA-MB-435S.luc

