



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

(21) BR 112020003945-4 A2



(22) Data do Depósito: 05/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 08/09/2020

(54) Título: ENTREGA DE CARGAS ÚTEIS A CÉLULAS-TRONCO

(51) Int. Cl.: C12N 5/09; C12N 9/74; C12N 9/64; C07K 14/755; C07K 19/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 05/09/2017 US 62/554,530; 05/09/2017 US 62/554,533; 06/10/2017 US 62/569,403; 06/10/2017 US 62/569,411; 10/11/2017 US 62/584,565; (...).

(71) Depositante(es): GLADIATOR BIOSCIENCES, INC..

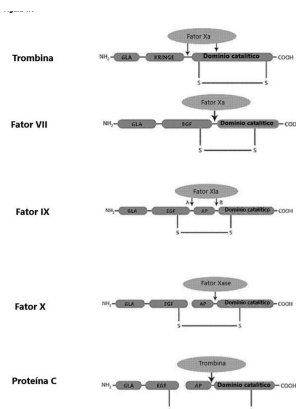
(72) Inventor(es): TERRY HERMISTON; MAXINE BAUZON; CHRISTOPHER H. CONTAG; JONATHAN HARDY; FRANCIS GERARD BLANKENBERG.

(86) Pedido PCT: PCT US2018049618 de 05/09/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/050997 de 14/03/2019

(85) Data da Fase Nacional: 27/02/2020

(57) Resumo: A presente divulgação se refere a um método de alvejar células-tronco, em particular células-tronco não apoptóticas, utilizando um domínio de GLA, capaz de se ligar à fosfatidil serina exposta à superfície.



“ENTREGA DE CARGAS ÚTEIS A CÉLULAS-TRONCO”

[0001] A presente divulgação se refere a um método de alvejar células-tronco, em particular células-tronco não apoptóticas, com uso de um domínio de GLA, por exemplo, para facilitar a entrada na célula.

ANTECEDENTES

[0002] Domínios de GLA estão contidos em um número de proteínas de GLA, como a Trombina, Fator VII, Fator IX, Fator X, Proteína C, Proteína S (PrS), Proteína Z, Osteocalcina, Proteína da matriz GLA, GAS6, Transtiretina, Periostina, GLA 1 rica em prolina, GLA 2 rica em prolina, GLA 3 rica em prolina e GLA 4 rica em prolina.

[0003] Dos domínios de GLA das chamadas proteínas de GLA são capazes de ligar fosfatidilserina (PtdS também chamado de PS) sobre a superfície de células apoptóticas, tais como células de câncer e células infectadas patogênicas. As moléculas que excluem o domínio catalítico, que se ligam especificamente à fosfatidil serina, são divulgadas nos documentos WO2014/151535 e WO2014/151683, aqui incorporados a título de referência.

[0004] Os domínios de GLA (carboxilação dependente de vitamina K/gama-carboxiglutâmico) são domínios de proteínas que foram modificados pela carboxilação pós-translacional dependente de vitamina K de resíduos de glutamato na sequência de aminoácidos para fornecer gama-carboxiglutamato (Gla).

[0005] O domínio de GLA liga íons de cálcio quelando-os entre dois resíduos de ácido carboxílico. Esses resíduos fazem parte de uma região que começa na extremidade de terminal N da forma madura das proteínas GLA e termina com um resíduo aromático conservado. Isso resulta em um motivo conservado de Gla-x(3)-Gla-x-Cys que é encontrado no meio do domínio, o que parece ser importante para o reconhecimento do substrato pela carboxilase.

[0006] Pensava-se que fosfatidil serina era um marcador conservado para as células apoptóticas e parte do mecanismo pelo

qual as células doentes reduzem a depuração imunológica ou tolerância imunitária induzida. Assim, foi levantada a hipótese de que os domínios de GLA só se ligam a células apoptóticas. No entanto, surpreendentemente, os presentes inventores estabeleceram que os domínios de GLA da presente divulgação podem ser utilizados para alvejar células-tronco, tais como células-tronco não apoptóticas e/ou células-tronco de câncer. Isso é ainda mais surpreendente, porque os inventores têm evidências para sugerir que células diferenciadas normalmente saudáveis não estão ligadas pelos domínios de GLA utilizados na presente divulgação.

[0007] Isso tem implicações importantes, por exemplo, para terapia de tronco, que é usada para tratar afecções como cânceres hematológicos, como leucemia. A terapia com células-tronco só pode ser administrada após a limpeza da medula óssea/células-tronco/sistema imunológico do paciente.

[0008] Esse processo de limpeza requer “terapias de obliteração”, por exemplo, altas doses de quimioterapia, radioterapia e/ou terapia de depleção de células B.

[0009] Essa "terapia de obliteração" tem muitos efeitos colaterais, por exemplo, dores na boca e na garganta (que podem dificultar a ingestão do paciente), náuseas e vômitos, suscetibilidade a infecções, como pneumonia e infecção por CMV, anemia, sangramento, infertilidade, disfunção cognitiva, etc. Esses efeitos colaterais são muito graves e difíceis para os pacientes, principalmente crianças. Melhoraria muito a qualidade de vida dos pacientes se esses efeitos colaterais pudessem ser minimizados ou eliminados.

[0010] Constatou-se que acabar com o sistema imune e reiniciá-lo também coloca formas agressivas de MS para a remissão. No entanto, o tratamento é reservado apenas para os casos mais graves, porque o risco associado ao tratamento é significativo. No entanto, a presente divulgação permite que a quimioterapia seja especificamente direcionada aos troncos, com uso do componente de GLA.

[0011] A presente invenção fornece um mecanismo para alvejar "especificamente" células-tronco, em particular células-tronco não apoptóticas. As células-tronco alvejadas pelo método podem, por exemplo, ser isoladas, tratadas (incluindo correção genética, aumento, adição), marcadas, transformadas e/ou eliminadas. Assim, o método da presente divulgação pode ser utilizado para fornecer intervenções terapêuticas para células-tronco, por exemplo, material genético e/ou material proteico e/ou terapias químicas.

[0012] Ao vincular o domínio de GLA da presente divulgação a um marcador detectável, como marcador fluorescente, marcador his ou etiqueta magnética, as células-tronco podem ser isoladas e classificadas etc. Isso pode ser útil em um diagnóstico ou isolamento de células-tronco para posterior manipulação para torná-las úteis em aplicação terapêutica.

SUMÁRIO DA DIVULGAÇÃO

[0013] A presente divulgação será resumida nos parágrafos "numerados" abaixo:

[0014] 1a. Um método para alvejar uma célula-tronco, sendo que o referido método compreende a etapa de contatar células com uma molécula que compreende uma carga útil ligada a um componente de ácido gama-carboxiglutâmico (componente de GLA)

[0015] em que o referido componente de GLA compreende um domínio de GLA ou um fragmento ativo do mesmo e não compreende um domínio catalítico ativo de uma proteína GLA.

[0016] 1b. Uma molécula que compreende uma carga útil ligada a um componente de ácido gama-carboxiglutâmico (componente de GLA),

[0017] em que o referido componente de GLA compreende um domínio de GLA ou um fragmento ativo do mesmo e não compreende um domínio catalítico ativo de uma proteína GLA para uso no tratamento ou diagnóstico de uma célula-tronco

[0018] 1c. Uma molécula que compreende uma carga útil ligada a um componente de ácido gama-carboxiglutâmico (componente de GLA),

[0019] em que o referido componente de GLA compreende um domínio de GLA ou um fragmento ativo do mesmo e não compreende um domínio catalítico ativo a partir de uma proteína GLA para uso na fabricação de um medicamento para tratamento ou diagnóstico de uma célula-tronco.

[0020] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c, em que o domínio de GLA ou seu fragmento ativo é selecionado independentemente a partir de trombina, fator VII, fator IX, fator X, proteína C, proteína S, proteína Z, osteocalcina, proteína GLA de matriz (MGP), GAS6, transtirretina (TTR), inibidor de inter-alfa-tripsina, periostina, gla 1 rica em prolina (PRRG1), gla 2 rica em prolina (PRRG2), gla 3 rica em prolina (PRRG3) e gla 4 rica em prolina (PRRG4).

[0021] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 2, em que o domínio de GLA ou fragmento ativo do mesmo é selecionado independentemente a partir de trombina, fator VII, fator IX, fator X, proteína C, proteína S, proteína Z e GAS6, por exemplo, o domínio de GLA da proteína S, em particular uma sequência mostrada na SEQ ID NO: 1.

[0022] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 3, em que o componente de GLA compreende ainda um domínio de EGF, por exemplo, um domínio de EGF de ligação ao cálcio.

[0023] Método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 4, em que a construção compreende um domínio de EGF selecionado a partir de trombina, fator VII, fator IX, fator X, proteína C, proteína S, proteína Z, Osteocalcina, proteína Matrix GLA, GAS6, Transtretina, Periostina, GLA 1 rico em prolina, GLA 2 rico em prolina, GLA 3 rico em prolina e GLA 4 rico em prolina.

[0024] Método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 5, em que o domínio de EGF selecionado a partir de trombina, fator VII, fator IX, fator X, proteína C, proteína S, proteína S, proteína Z e GAS6, por exemplo, o domínio de EGF da proteína S.

[0025] Método ou molécula para uso de acordo com qualquer um dos parágrafos 1a, 1b ou 1c a 6, em que o componente de GLA compreende uma sequência mostrada na SEQ ID NO: 6 ou um seu derivado excluindo o marcador his.

[0026] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 7, em que o componente do domínio de GLA compreende ainda um domínio Kringle.

[0027] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 8, em que o domínio Kringle é de uma proteína selecionada do grupo que compreende o Fator de transcrição de ativação 2 (ATF); Fator XII (F12); trombina (F2); Proteína de ligação a hialuronano 2 (HABP2); Fator de crescimento de hepatócitos (HGF); Ativador do fator de crescimento de hepatócitos (HGFAC); Proteína 1 de Kremen (KREMEN1); KREMEN2; Lipoproteína(a) (LPA); LPAL2; Proteína estimuladora de macrófagos (MSP ou MST1); Proteína 1 que interage com fosfoinositida-3-cinase (PIK3IP1); Ativador de plasminogênio tecidual (PLAT); Uroquinase (PLAU); Plasmina (PLG); PRSS12; Tirosina-cinase de proteína do receptor da transmembrana ROR1 (ROR1); e tirosina-cinase de proteína do receptor da transmembrana ROR2 (ROR2).

[0028] Um método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1a, 1b, 1c a 9, em que o método é realizado *in vitro*.

[0029] Um método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1a, 1b, 1c a 10, em que a entrega é para uma célula *in vivo*, por exemplo, em que a molécula que compreende o componente de GLA e a carga útil são administradas a um paciente, por exemplo, um paciente humano.

[0030] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 11, em que a molécula tem como alvo o exterior de uma célula-tronco.

[0031] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 12, em que a molécula é internalizada em uma célula-tronco.

[0032] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 13, em que a célula é não apoptótica (isto é, uma célula-tronco saudável).

[0033] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 13, em que a célula é apoptótica, por exemplo, uma célula-tronco doente.

[0034] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 15, em que a célula-tronco é uma célula-tronco adulta, por exemplo, incluindo células progenitoras e células-tronco hematopoiéticas, células-tronco miogênicas, células-tronco osteoprogenitoras, células-tronco neurais, células-tronco mesenquimais, tais como células satélites, células gliais radiais, células estromais da medula óssea, periósteo, células progenitoras pancreáticas, células progenitoras endoteliais, células blásticas e células-tronco trofoblásticas.

[0035] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 16, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície CD34.

[0036] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 17, em que a célula-tronco é negativa para marcadores de superfície positivos para a linhagem (isto é, é Lin-ve).

[0037] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 18, em que a célula-tronco é Lin-ve, CD34 +ve, CD38 -ve, CD45RA -ve, CD90 positivo e CD49f _+ve.

[0038] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 17, em que a célula-tronco é uma célula-tronco hematopoiética.

[0039] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 20, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície de CD48, CD150, CD244, CD34, CD38, SCA-1, Thy1.1, C-kit, lin, CD135, slamf1/CD150, Mac-1 (CD11b), CD4, fator de célula-tronco (SCF) e combinações de dois ou mais do mesmo.

[0040] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 19, em que a célula-tronco é uma célula osteoprogenitora.

[0041] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 22, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície selecionado de Gremlin-1, TGF-beta, bFGF, BMP-2, ALPP, MCAM, Colágeno I, Colágeno 1 alfa 1, Colágeno II, RUNX2, Decorin e combinações de dois ou mais do mesmo (como todos os referidos marcadores).

[0042] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 22 ou 23, em que as células-tronco são osteoblastos ou um progenitor dos mesmos.

[0043] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 24, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície selecionado de Runx2, fosfatase alcalina/ALPP/ALPI, osteocalcina, BAP1, OPN, BAP31, colágeno I, SCUBE3, fibronectina, SPARC, IGFBP-3, e combinações de dois ou mais dos mesmos (como todos os referidos marcadores).

[0044] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 16, em que a célula-tronco é um osteócito ou seu progenitor.

[0045] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 26, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície

selecionado entre TGF beta, RANKL, MCSF, Esclerostina, DKK e combinações de dois ou mais dos mesmos (como todos os referidos marcadores).

[0046] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 26, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície selecionado de Osterix +ve, CD90 +ve, osteocalcina +ve, colágeno I +ve, sialoproteína óssea +ve e combinações de dois ou mais dos mesmos (como todos os referidos marcadores).

[0047] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 26, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície selecionado de fosfatase alcalina/ALPP (fosfatase alcalina placentária)/ALPI +ve, colágeno I +ve, colágeno II +ve, decorina +ve, MCAM/CD146 +ve, MEPE/OF45 +ve, osterix +ve, CD90 +ve, osterix/Sp7 +ve, RUNX2/CBFA1 +ve, trombopoietina/Tpo +ve e combinações de dois ou mais do mesmo (como todos os referidos marcadores).

[0048] Um método ou molécula para uso de acordo com qualquer um dos parágrafos 1a, 1b ou 1c a 19, em que a célula-tronco é uma célula-tronco miogênica.

[0049] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 30, em que a célula-tronco expressa um marcador selecionado de CD56, CD146, VE-caderina, actina do músculo alfa-liso, FABP3, integrina alfa 7, desmina, cadeia pesada de miosina, receptor UEA-1, e combinações de dois ou mais dos mesmos (como todos os referidos marcadores).

[0050] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 19, em que a célula-tronco é uma célula-tronco neural.

[0051] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 32, em que a célula-tronco expressa um marcador selecionado de CD133, CD15, CD24 baixo ou -ve, GCTM-2, CD45, CD34, Nestin, Sox-2, ABCG2, FGF R4, Frizzled -9 e combinações de dois ou mais dos mesmos (como todos os referidos marcadores).

[0052] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 33, em que o marcador CD24 é baixo ou -ve.

[0053] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 33 ou 34, em que a célula-tronco expressa uma combinação de marcadores CD133 +ve, 5E12 +ve, CD34 -ve, CD45 -ve e CD24 baixo ou -ve.

[0054] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 19, em que a célula-tronco é uma célula-tronco mesenquimal.

[0055] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 36, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície, selecionado dentre CD10, CD13, CD73, CD105, CD271, CD140b, CD240, frizzled-9, CD29, CD90, CD146, oct4, SSEA4, STRO-1, fator de células-tronco (SCF) e combinações de dois ou mais do mesmo.

[0056] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 19, em que a célula-tronco é derivada de adiposo.

[0057] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 38, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície selecionado de K15, CD34, Nestlin, folistatina, p63, integrina alfa 6, teacin C, EGFR, IGFR, fatores frizados e combinações de dois ou mais do mesmo.

[0058] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 38 ou 39, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície selecionado entre CD44, ICAM/CD54, CD34, membros da família integrina e combinações de dois ou mais do mesmo.

[0059] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 19, em que a célula-tronco é uma célula-tronco epitelial de ovário e tubária.

[0060] Um método de acordo com o parágrafo 41, em que a célula-tronco expressa um marcador de superfície selecionado dentre

Gremlin 1, Lrig1, Lgr5, Bmi1, Tert, HopX e combinações de dois ou mais do mesmo.

[0061] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 15, em que a célula-tronco é uma célula-tronco embrionária.

[0062] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 43, em que a célula-tronco pode ser identificada com base em um ou mais marcadores de superfície selecionados de CD24, CD29, CD31, CD59, CD90, CD117, CD133, CD324, CD326, SSEA- 3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, frizzled5, fator de células-tronco, criptografia (TDGF-1).

[0063] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 44, em que a célula-tronco é não cancerígena.

[0064] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 44, em que a célula-tronco é uma célula-tronco de câncer.

[0065] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 46, em que a célula-tronco do câncer é de origem epitelial.

[0066] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 46 ou 47, em que as células-tronco cancerígenas expressam um marcador de superfície selecionado a partir de CD44 (que é super expresso em pelo menos câncer de mama, ovário, próstata, pancreático, escamoso e vesical), CD133 (que é superexpresso em pelo menos cérebro, cólon, pulmão, câncer de próstata e meduloblastoma), CD24, CD90, CD271, CD4f, CD13 e combinações de dois ou mais do mesmo (outros marcadores incluem ABCB5 +, CD44 +/CD24, CD34+/CD38- e CD44+/ESA+).

[0067] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 46, em que a célula-tronco é de origem hematopoiética.

[0068] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 49, em que a célula tem um marcador selecionado de CD19, WT-1 e combinações dos mesmos.

[0069] Um método ou molécula para uso de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 50, em que o componente de GLA é conjugado à carga útil.

[0070] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 51, em que a carga útil compreende um agente terapêutico, um agente de alveamento e/ou um marcador.

[0071] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 52, em que o agente terapêutico é uma entidade química ou molécula biológica (como uma proteína), por exemplo, um fármaco anticâncer, uma terapia anticâncer, um agente quimioterápico, vírus ou vetor viral, como um vírus oncolítico.

[0072] Um método ou molécula para uso de acordo com os parágrafos 1a, 1b ou 1c a 53, em que a carga útil é selecionada a partir de uma toxina, um polímero (por exemplo, polímeros sintéticos ou de ocorrência natural), proteínas biologicamente ativas (por exemplo, enzimas, outro anticorpo ou fragmentos de anticorpo), um fármaco (por exemplo, molécula pequena (entidade química) ou agente quimioterapêutico), ácidos nucleicos e seus fragmentos (por exemplo, DNA, RNA como shRNA e siRNA e seus fragmentos, incluindo gRNA para radionuclídeos CRISPRCas9 e CRISPRa/i (particularmente radioiodeto, radioisótopos) um agente quelante de metal, nanopartículas e grupos repórteres (como marcadores fluorescentes ou luminescentes ou compostos que podem ser detectados por espectroscopia de RMN ou ESR).

[0073] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 54, em que a toxina é selecionada de uma auristatina (por exemplo MMAE (monometil auristatina E), MMAF (monometil auristatina F)), pirrolobenzodiazepina (PBD), doxorubicina, duocarmicina, um maitansinoide (por exemplo N 2'-desacetil-N 2'-(3-mercaptopropil)-maitansina (DM1), N 2'-desacetil-N2'-(4-mercaptopentil)-maitansina (DM3) e N 2'-desacetil-N 2'(4-metil-4-mercaptopentil)-maitansina (DM4)), caloceamicina, dolastatina, maitansina, α -amanitina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE38), cadeia

ricina A, toxina difteria, proteína antiviral Pokeweed (PAP), saporina, gelonina e uma tubulisina.

[0074] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 53, em que o quimioterapêutico é selecionado a partir de temozolomida, epotilonas, melfalano, carmustina, bussulfano, lomustina, ciclofosfamida, dacarbazina, polifeprosan, ifosfamida, clorambucil, mecloretamina, bussulfano, ciclofosfamida, carboplatina, cisplatina, tiotepa, capecitabina, estreptozocina, bicalutamida, flutamida, nilutamida, acetato de leuprolida, cloridcamundongo de doxorubicina, sulfato de bleomicina, cloridcamundongo de daunorubicina, dactinomicina, citcamundongo de daunorubicina lipossomal, cloridcamundongo de doxorubicina lipossomal, epirubicina cloridcamundongo, idarrubicina cloridcamundongo, mitomicina, doxorubicina, valrubicina, anastrozol, citcamundongo de toremifeno, citarabina, fluorouracil, fludarabina, floxuridina, interferon α -2b, plicamicina, mercaptopurina, metotrexato, interferon α -2a, acetato de medroxiprogersterona, fosfato de estramustina sódico, estradiol, acetato de leuprolide, acetato de megestrol, acetato de octreotideolato, difosfato de desitilstilbestil, testolactona, acetato de goserlina, fosfato de etoposídeo, sulfato de vincristina, etoposídeo, vinblastina, etoposídeo, sulfato de vincristina, teniposídeo, trastuzumabe, ozogamicina de gemtuzumabe, rituximabe, exemestano, cloridcamundongo de irinotecano, asparaginase, cloridcamundongo de gencitabina, altretamina, cloridcamundongo de topotecano, hidroxíureia, cladribina, mitotano, cloridcamundongo de procarbazina, tartacamundongo de vinorelbina, pentrostatina sódica, mitoxantrona, pegaspargase, denileucina diftitix, altretinoína, porfímero, bexaroteno, paclitaxel, docetaxel, trióxido de arsênio, tretinoína e combinações de dois ou mais do mesmo.

[0075] Um método ou molécula para uso de acordo com qualquer um dos parágrafos 52 a 54, em que o quimioterápico é selecionado a partir de um agente alquilante, um antimetabolito incluindo inibidores da

timidilato sintase, um taxano, uma antraciclina, um agente antimicrobiano incluindo alcaloides vegetais e combinações de dois ou mais dos mesmos.

[0076] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 57, em que o quimioterápico é selecionado a partir de paclitaxel, docetaxel, abraxane, carbazitaxel, derivados de qualquer um dos mesmos e combinações de dois ou mais dos itens acima mencionados.

[0077] Um método de acordo com o ponto 57 ou 58, em que o agente de alquilação é selecionado a partir de um ni trogênio mostarda, uma nitrosourea (tal como carmustina), um tetrazina, um aziridina, um platina e seus derivados, um agente alquilante não clássico e uma combinação de dois ou mais dos mesmos.

[0078] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 59, em que a platina é selecionada de cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, satraplatina, picoplatina, nedaplatina, triplatina, lipoplatina e uma combinação de duas ou mais das mesmas.

[0079] Um método ou molécula para uso de acordo com qualquer um dos parágrafos 57 ou 58, em que o agente alquilante é um antimetabolito selecionado dentre anti-folatos (por exemplo, metotrexato e pemetrexedo), análogos de purina (por exemplo, tiopurinas, tais como azatiopurina, mercaptopurina, tiopurina, fludarabina (incluindo a forma de fosfato), pentostatina e cladribina), análogos de pirimidina (por exemplo, fluoropirimidinas, como 5-fluorouracil e pró-fármacos, tais como capecitabina [Xeloda®]), floxuridina, gemcitabina, citarabina, decitabina, cloridcamundongo de raltitrexedo (tomudex), cladribina e 6-azauracil e combinação de dois ou mais dos mesmos.

[0080] Um método ou molécula para uso de acordo com qualquer um dos parágrafos 56 a 60, em que a antraciclina é selecionada de daunorrubicina (Daunomycin), daunorrubicina (lipossomal), doxorrubicina (Adriamicina), doxorrubicina (lipossomal), epirubicina, idarubicina, mitoxantrona e uma combinação de dois ou mais dos mesmos, em particular doxorrubicina.

[0081] Um método ou molécula para uso de acordo com qualquer um dos parágrafos 53 a 62, em que o medicamento é um fármaco anticâncer, por exemplo, selecionado a partir de um inibidor de topoisomerase, um inibidor de PARP e uma combinação dos mesmos.

[0082] Um método ou molécula para uso de acordo com qualquer um dos parágrafos 53 a 64, em que a terapia anticâncer é um radionuclídeo, por exemplo, selecionado entre Y-90, P-32, I-131, In-111, Sr-89, Re-186, Sm-153, Sn-117m e uma combinação de dois ou mais dos mesmos.

[0083] Um método ou molécula para uso de acordo com qualquer um dos parágrafos 1a, 1b ou 1c a 64, que compreende a administração da molécula compreendendo o componente de GLA e a carga útil a um paciente com câncer, por exemplo, onde o câncer é refratário.

[0084] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 65, em que o câncer é um câncer epitelial, por exemplo, câncer colorretal, câncer testicular, câncer de fígado, câncer do tcamundongo biliar, glioblastômero, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático, câncer de mama, câncer de ovário, câncer cervical, câncer uterino, câncer gástrico, câncer esofágico, câncer de tireoide, câncer renal, câncer de bexiga, câncer cerebral, câncer de cabeça e pescoço ou câncer de pulmão ou, alternativamente, o câncer pode ser um câncer hematológico, por exemplo, leucemia, linfoma, mieloma e câncer doenças mieloproliferativas, como LMA, LMC, LLA e LLC.

[0085] Um método ou molécula para uso de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 66, em que a carga útil é convertida em uma forma ativa dentro da célula.

[0086] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 67, em que a conversão para a forma ativa é realizada por uma enzima.

[0087] Um método ou molécula para uso de acordo com o parágrafo 68, em que a enzima é selecionada de uma carboxilesterase, acetilcolinesterase, paraoxonase (como paraoxonase 2), metaloproteases da

matriz, fosfatase alcalina, β -glucuronidase, purina-nucleosídeo fosforilase, beta-lactamase (para exemplo, produzido por mycobacterium tuberculosis e kansasii) e citosina desminase.

[0088] Um método ou molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 69, em que o componente de GLA tem a sequência mostrada na SEQ ID NO: 6 ou uma sequência equivalente excluindo o marcador His.

[0089] Em uma modalidade, o componente de GLA liga fosfatidilserina exposta à superfície nas células, antes da internalização.

[0090] Embora não desejando estar limitado pela teoria, os presentes inventores acreditam que nem toda fosfatidilserina é equivalente do ponto de vista biológico. Os inventores acreditam que a fosfatidilserina exposta pela enzima TMEM16F está envolvida na supressão imunológica e é a "vista" pelas moléculas da presente divulgação.

[0091] Em uma modalidade, a célula-tronco é uma célula-tronco adulta ou vesícula derivada dela, por exemplo, células-tronco somáticas, como uma célula-tronco hematopoética, uma célula-tronco mesenquimal ou uma célula-tronco estromal.

[0092] Em uma modalidade, a célula-tronco é uma célula-tronco embrionária ou uma vesícula dela derivada. Em uma modalidade, a célula não é uma célula-tronco embrionária.

[0093] Em uma modalidade, o método se refere a células-tronco de mamíferos, por exemplo, células-tronco humanas. As células-tronco aqui discutidas são principalmente células-tronco humanas. No entanto, o especialista é capaz de identificar a população de células-tronco relevante ou correspondente para outros mamíferos, conforme necessário. Por exemplo, **SSEA-1** é um marcador para células-tronco embrionárias murinas, células da linha germinativa humana e células de carcinoma embrionário; **SSEA-3** é um marcador para células-tronco embrionárias de primatas, células germinativas embrionárias humanas, células-tronco embrionárias humanas e células de

carcinoma embrionário; **SSEA-4** é um marcador para células-tronco embrionárias de primatas, células germinativas embrionárias humanas, células-tronco humanas, células de carcinoma embrionário; **CD324** é um marcador para células-tronco embrionárias humanas e murinas, células cancerígenas embrionárias; **CD90** é um marcador para células-tronco embrionárias humanas e murinas, células-tronco hematopoiéticas, células de carcinoma embrionário; **CD117** é um marcador para células-tronco embrionárias humanas e murinas, células progenitoras hematopoiéticas, melanócitos derivados de crista neural, células germinativas primordiais, células de carcinoma embrionário; **CD326** é um marcador para células-tronco embrionárias humanas e murinas, células de carcinoma embrionário; **CD9** é um marcador para troncos embrionários humanos e murinos; **CD24** é um marcador para troncos embrionários humanos e murinos; **CD29** é um marcador para troncos embrionários humanos e murinos; **CD59** é um marcador para troncos embrionários humanos e murinos; **CD133** é um marcador para troncos embrionários humanos e murinos, células de carcinoma embrionário, células-tronco hematopoiéticas; **CD31** é um marcador para troncos embrionários humanos e murinos; **TRA-1-60** é um marcador para células-tronco embrionárias humanas, teracarcinoma, células germinativas embrionárias, células de carcinoma embrionário; **TRA-1-81** é um marcador para células-tronco embrionárias humanas, teracarcinoma, células germinativas embrionárias, células de carcinoma embrionário; **Frizzled5** é um marcador para células-tronco embrionárias humanas e murinas; **O fator de células-tronco (SCF)** é um marcador para células-tronco humanas e embrionárias, células-tronco hematopoiéticas, células-tronco mesenquimais, células de carcinoma embrionário; e **Cripto** é um marcador para células-tronco embrionárias humanas e murinas, cardiomiócitos e células de carcinoma embrionário.

[0094] Em uma modalidade, a carga útil compreende um agente terapêutico.

[0095] Em uma modalidade, a carga útil compreende um marcador detectável.

[0096] Em uma modalidade, a carga útil compreende uma sequência de DNA ou RNA, por exemplo, cDNA compreendendo um transgene ou uma sequência de RNAi (como miRNA, siRNA incluindo shRNA). O DNA que codifica um transgene pode receber um DNA transcricionalmente ativo ou um plasmídeo para expressão transitória ou estável.

[0097] Em uma modalidade, a carga útil é adequada para induzir a diferenciação da célula-tronco, por exemplo, para ativar e/ou amadurecer a célula em uma linhagem específica.

[0098] Em uma modalidade, o método da presente divulgação compreende um pré-tratamento de um paciente, por exemplo, para induzir ou aumentar a expressão de PS em células-tronco, por exemplo, a etapa de pré-tratamento pode ser tratamento com terapia de radiação, em particular irradiação de células da medula óssea.

[0099] A divulgação também se estende a composições farmacêuticas que compreendem uma molécula para utilização de acordo com a presente divulgação, em particular para utilização como aqui descrito. Assim, em uma modalidade, as moléculas de acordo com a presente divulgação são utilizadas no tratamento de um alvo intracelular.

[0100] A presente divulgação também se refere à utilização de um componente GLA que compreende um domínio de GLA ou um fragmento ativo do mesmo, em que o referido componente de GLA não compreende um domínio catalítico ativo de uma proteína GLA, por segmentação e entrega intracelular (incluindo entrega intracelular da carga).

[0101] A presente divulgação também se refere à utilização de um componente de GLA que compreende um domínio de GLA ou um fragmento ativo do mesmo, em que o referido componente de GLA não compreende um domínio catalítico ativo de uma proteína GLA, para a fabricação de um medicamento para alveamento e entrega intracelular (incluindo entrega intracelular da carga útil, em particular quando a carga útil compreende uma entidade/molécula terapêutica).

[0102] A presente tecnologia pode ser utilizada para eliminar as células do sistema imunológico do paciente antes da transplantação de células-tronco, por exemplo, a carga útil será geralmente uma quimioterapia, por exemplo, compreendendocarmustina.

[0103] Um regime atual para ablação de células imunes é (BCNU) 300 mg/m² no dia -6, etoposídeo 200 mg/m² e citarabina 200 mg/m² diariamente do dia -5 a -2, e melfalan 140 mg/m² no dia -1 (BEAM). Globulina antitimócitos de coelho (2,5 mg/kg/d) foi administrado nos dias -2 e -1. Este regime pode ser adaptado conjugando cada um dos agentes a uma molécula de GLA da presente divulgação.

[0104] Em uma modalidade, a obliteração imunológica é para câncer, para um câncer hematológico (por exemplo é selecionado a partir de mieloma, linfoma, leucemia, como leucemia mieloide aguda (LMA), doença mieloproliferativa crônica, gamopatia monoclonal de significado incerto, síndrome mielodisplásica e amiloidose, como LMA, LMC, LLC ou LLA)

[0105] Em uma modalidade, o mieloma é selecionado a partir de mieloma múltiplo, amiloidose e plasmocitoma.

[0106] Em uma modalidade, o mieloma é selecionado a partir de gamopatia monoclonal de significado indeterminado, mieloma assintomático, mieloma sintomático e doença de Kahler.

[0107] Em uma modalidade, o linfoma é selecionado a partir de linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Burkitt, linfoma do tipo Burkitt, linfoma cutâneo de células T, linfoma difuso de células B grandes, linfoma difuso de células B grandes, linfoma linfoblástico, linfoma MALT, linfoma de células do manto, linfoma de células B grandes mediastinais, linfoma de células B da zona marginal nodal, linfoma linfocítico pequeno, linfoma de tireoide e macroglobulinemia de Waldenstrom.

[0108] Em uma modalidade, a doença mieloproliferativa crônica é selecionada a partir de trombocitemia essencial, mielofibrose idiopática crônica e policitemia rubra vera.

[0109] Em uma modalidade, a leucemia é selecionada a partir de leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia de células cabeludas, leucemia linfoblástica aguda e leucemia linfoblástica crônica, como a LMA.

[0110] Recentemente tornou-se evidente que, para doenças autoimunes graves, tais como a esclerose múltipla grave e obliteração de artrite grave de células do sistema imunológico, seguido por transplante de tronco pode colocar a doença em remissão. Assim, a terapia de ablação da presente divulgação pode ser utilizada em uma doença autoimune, como esclerose múltipla e artrite.

[0111] Em uma modalidade, a molécula de GLA da presente divulgação está ligada, por exemplo, conjugada, a uma carga útil que compreende um marcador detectável. Exemplos de marcadores detectáveis são fornecidos abaixo. O marcador detectável pode ser utilizado para classificar ou isolar as células-tronco, por exemplo, utilizando classificação de FACs, classificação magnética ou similar. Assim, em uma modalidade, é fornecido um método para isolar ou enriquecer células-tronco utilizando uma molécula de GLA da presente divulgação. Isso é vantajoso porque historicamente o isolamento de certas populações de células-tronco, como as células-tronco do câncer, tem sido muito difícil.

[0112] A molécula de GLA marcada pode também ser utilizada in vivo como um agente de imagiologia, em particular, como ferramenta de diagnóstico, por exemplo, para identificar as células-tronco do câncer em tumores primários ou metastizar. Isso pode ser importante para monitorar os pacientes após a cirurgia e/ou quimioterapia para garantir que o câncer esteja em remissão.

[0113] As cargas úteis de transgene de DNA e/ou aglutinante de cargas úteis de RNA à molécula de GLA podem ser utilizadas como uma entrega intracelular alternativa a uma entrega de vetor viral (transdução) ou transfecção tradicional. Isso pode ser utilizado *in vitro* para expressar proteínas exógenas ou endógenas na célula (por exemplo, onde as células-tronco modificadas são para reinfusão em um paciente) ou pode ser efetuado *in vivo*. Os genes podem ser expressos transitoriamente ou podem ser projetados para serem integrados de maneira estável na célula-tronco.

[0114] Surpreendentemente, os presentes inventores demonstraram que as moléculas, de acordo com a presente divulgação, não apenas se ligam às células-tronco, elas são rapidamente internalizadas nela, juntamente com a carga útil a elas ligada.

DIVULGAÇÃO DETALHADA

[0115] Entrega intracelular, tal como aqui utilizada, se refere ao deslocamento, por exemplo, da carga de utilização para o interior da célula.

[0116] Em uma modalidade, a carga útil não é internalizada.

[0117] Em uma modalidade, o componente de GLA e a carga útil não são internalizados.

[0118] Carga útil, tal como aqui utilizada, se refere a uma molécula que é ligada ao domínio de GLA, em particular, com a finalidade de entrega intracelular. O enlace pode ser um enlace por conjugação química usando, por exemplo, química da maleimida ou clique em química para ancorar à fração a uma lisina exposta a solvente. Alternativamente, o enlace pode ser uma fusão, por exemplo, uma ligação peptídica em que a entidade ligada é expressa como uma proteína de fusão com o componente de GLA, por exemplo, isso pode ser adequado para certos marcadores detectáveis, como proteínas fluorescentes ou anticorpos. Os aglutinantes podem ser utilizados entre o componente de GLA e a carga útil. As cargas úteis podem compreender um

fármaco, uma toxina, um polímero, uma proteína biologicamente ativa, vírus terapêutico, vírus oncolítico, vetor viral, radionuclídeos, um agente quelante de metal e/ou um grupo repórter (como um marcador).

[0119] Em uma modalidade, 1, 2, 3, 4 ou 5 cargas úteis estão ligadas por componente de GLA.

[0120] O componente de GLA (também aqui referido como um componente ácido gama-carboxiglutâmico) se refere a um polipeptídeo compreendendo um domínio de GLA na ausência de domínio catalítico de uma proteína GLA, como a proteína S. O polipeptídeo pode ainda compreender um domínio de EGF e/kringle, por exemplo, da proteína S. Em uma modalidade, o componente de GLA compreende 30 a 300 resíduos de aminoácidos, por exemplo 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 ou 300 resíduos. Em uma modalidade, o componente de GLA está na faixa de 4,5 a 30kDa. Em uma modalidade, o componente de GLA compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 1. Em uma modalidade, o componente de GLA compreende uma sequência mostrada na SEQ ID NO: 6 ou um derivado do mesmo excluindo a etiqueta his.

[0121] Os domínios de GLA (carboxilação dependente de vitamina K/gama-carboxiglutâmico), conforme aqui utilizados, são domínios proteicos que foram modificados pela carboxilação pós-traducional dependente de vitamina K de resíduos de glutamato na sequência amino para fornecer gama-carboxiglutamato (Gla). Em uma modalidade, o domínio de GLA utilizado nas moléculas da presente divulgação compreende 30 a 45 resíduos consecutivos de um domínio de GLA nativo (do tipo selvagem). Em uma modalidade, o domínio de GLA compreende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 resíduos de GLA.

[0122] Em uma modalidade 30% ou menos do componente de GLA são resíduos de GLA.

[0123] Em uma modalidade, o componente de GLA compreende 1 a 5 ligações de dissulfureto, por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 ligações dissulfureto.

[0124] O domínio GLAs liga íons de cálcio quelando-os entre dois resíduos de ácido carboxílico. Esses resíduos fazem parte de uma região que começa na extremidade N-terminal da forma madura das proteínas Gla e termina com um resíduo aromático conservado. Isso resulta em um motivo conservado de Gla-x(3)-Gla-x-Cys que é encontrado no meio do domínio e que parece ser importante para o reconhecimento do substrato pela carboxilase.

[0125] Os domínios de GLA estão contidos em várias proteínas, como Trombina, Fator VII, Fator IX, Fator X, Proteína C, Proteína S (PrS), Proteína Z, Osteocalcina, Proteína matriz GLA, GAS6, Transtretina, Periostina, GLA 1 rica em prolina, GLA 2 rica em prolina, GLA 3 rica em prolina e GLA 4 rica em prolina.

[0126] Domínio de GLA, conforme aqui utilizado, também se estende a proteínas em que 1 a 10 por cento (como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10%) dos aminoácidos no domínio nativo de GLA pode ser substituído e excluído, desde que o domínio modificado retenha pelo menos 70% (como 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100%) da atividade nativa do nativo (domínio de GLA não modificado) em um ensaio *in vitro* adequado.

[0127] Domínio de EGF, tal como aqui utilizado se refere a um domínio conservado de proteína. Ele compreende cerca de 30 a 40 resíduos de aminoácidos e foi encontrado em um grande número de proteínas principalmente animais. A maioria das ocorrências do domínio do tipo EGF é encontrada no domínio extracelular de proteínas ligadas à membrana ou em proteínas conhecidas por serem secretadas. O domínio do tipo EGF inclui 6 resíduos de cisteína. A estrutura principal de domínios do tipo EGF é uma β -folha de duas cadeias seguido por um ciclo para uma β -folha de duas cadeias terminal C curto. Essas duas folhas β são geralmente indicadas como folhas principais (terminal N) e secundárias (terminal C). Domínios do tipo EGF

frequentemente ocorrem em inúmeras cópias dispostas em tandem em proteínas: estas repetições tipicamente dobram em conjunto para formar um único bloco de domínio solenoide linear, como uma unidade funcional. Em uma modalidade, o domínio utilizado é o domínio nativo completo.

[0128] Domínio EGF tal como aqui utilizado também se refere a proteínas em que 1 a 10 por cento (tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10%) dos aminoácidos no domínio nativo EGF podem ser substituídos e excluídos, desde que o domínio modificado retenha pelo menos 70% (como 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100%) da atividade nativa do nativo (domínio de EGF não modificado) em um ensaio *in vitro* adequado. Em uma modalidade, a proteína é o domínio nativo completo.

[0129] Domínio Kringle tal como aqui utilizado se refere a domínios autônomos de proteínas que se dobram em grandes laços estabilizadas por 3 ligações dissulfureto. Eles são caracterizados por uma estrutura de ponte tripla com 3 dissulfetos, cuja conformação é definida por várias ligações de hidrogênio e pequenos pedaços de folha beta antiparalela. Eles são encontrados em toda a coagulação sanguínea e proteínas fibrinolíticas, em um número variável de cópias, em algumas proteínas plasmáticas, incluindo o ativador do plasminogênio do tipo protrombina e uroquinase, que são serina proteases pertencentes à família MEROPS peptidase S1A.

[0130] Domínio Kringle, conforme aqui utilizado, também se refere a proteínas em que 1 a 10 por cento (como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10%) dos aminoácidos no domínio kringle nativo podem ser substituídos e excluídos, desde que o domínio modificado retenha pelo menos 70% (como 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100%) da atividade nativa do nativo (domínio Kringle não modificado) em um ensaio *in vitro* adequado. Em uma modalidade, o domínio utilizado é o domínio nativo completo.

[0131] Um fragmento ativo de uma proteína, conforme aqui utilizado, é menor que a proteína nativa inteira (ou domínio relevante), que retém pelo menos 50% (como 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94,

95, 96, 97, 98, 99 ou 100%) do ativo do domínio nativo de comprimento total ou proteína em um ensaio *in vitro* relevante.

[0132] Domínio catalítico, conforme aqui utilizado, é um domínio (ou fragmento) a jusante do domínio de EGF na direção do terminal C, por exemplo, como ilustrado na Figura 1A.

[0133] *In vitro*, como utilizado aqui, se refere a trabalhos de laboratório não realizados em um corpo humano ou animal.

[0134] *In vivo* tal como aqui utilizado se refere a trabalho/teste/tratamento em um organismo vivo, em particular um ser humano ou animal.

[0135] Célula-tronco, tal como aqui utilizada, se refere a células não diferenciadas que são capazes de diferenciação e inclui as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas, em particular de células-tronco adultas.

[0136] Células-tronco hematopoiéticas (HSCs) ou hemocitoblastos são as células-tronco que dão origem a todas as outras células sanguíneas através do processo de hematopoiese. Eles são derivados do mesoderma e estão localizados na medula óssea vermelha, que está contida no núcleo da maioria dos ossos.

[0137] Célula-tronco cancerígena, tal como aqui utilizado, se refere a células tumorigênicas (isto é, células cancerosas encontradas dentro de tumores ou cânceres hematológicos) que possuem as características associadas com células-tronco normais, especificamente a capacidade de dar origem a todos os tipos de células encontrados em uma amostra específica de câncer. Conferir, por exemplo, Identification and Targeting of Cancer Stem Cells, BioessayS 31 de outubro de 2009 (10) 1.038 a 1.049. As células-tronco cancerígenas são definidas por três propriedades distintas: i) capacidade seletiva de iniciar tumores e impulsionar a proliferação neoplásica; ii) capacidade de criar infinitas cópias de si mesmas por meio da autorrenovação e iii) o potencial de dar origem a progênes mais maduras do

câncer de células-tronco através da diferenciação. As células-tronco do câncer não são necessariamente derivadas de uma célula-tronco saudável, mas podem se originar de uma célula diferenciada.

[0138] CD34, também é conhecido como antígeno CD34 das células progenitoras hematopoiéticas, tem uma função como fator de adesão célula-célula. Ele pode ser utilizado como um marcador para enriquecer populações de tronco.

[0139] Molécula, como utilizada aqui, é usada no sentido mais amplo e inclui uma molécula química sintética, mas também macromoléculas como proteínas, polímeros (naturais ou não), moléculas de ácido ribonucleico, marcadores etc.

[0140] As cargas úteis podem compreender um fármaco, uma toxina, um polímero, uma proteína biologicamente ativa, radionuclídeos, um agente quelante de metal e/ou um grupo repórter.

[0141] Um fármaco como aqui utilizado, a menos que o contexto indique o contrário, se refere a uma pequena entidade química, por exemplo, que foi sintetizada por métodos de química orgânica, em particular uma molécula aprovada ou licenciada ou em processo de ser licenciada para uso terapêutico, especialmente em humanos. O fármaco, como aqui utilizado, também inclui um composto antiviral, um antibiótico e uma terapia anticâncer.

[0142] Um composto antiviral (agente antiviral), conforme utilizado neste documento, se refere à classe de medicamentos usados especificamente para o tratamento de infecções virais, incluindo agentes antivirais de amplo espectro e também espectro "estrito" específico para um vírus em particular ou família particular de vírus.

[0143] Antibiótico, tal como aqui utilizado se refere a medicamento ou agente que inibe o crescimento de bactérias ou destrói as bactérias. Antibacteriano e antibiótico são intercambiáveis aqui, a menos que o contexto indique o contrário.

[0144] Antiparasitário, tal como aqui utilizada se refere a um medicamento ou agente que inibe o crescimento do parasita, destrói parasita ou remove parasitas do hospedeiro.

[0145] Terapia anticâncer é um termo amplo que inclui medicamentos anticâncer, quimioterapia, radioterapia, terapias imunológicas, etc.

[0146] Fármaco anticâncer, conforme aqui utilizado, geralmente se refere a uma terapia de câncer de molécula pequena.

[0147] Quimioterapia aqui se refere geralmente a um agente citotóxico e inclui antineoplásicos.

[0148] Um agente terapêutico biológico (também conhecido como biofarmacêutico ou biológico) é um produto terapêutico "derivado" de uma fonte biológica, por exemplo, proteínas e fragmentos recombinantes, incluindo moléculas de anticorpos, incluindo anticorpos, fragmentos de ligação a anticorpos e moléculas de anticorpo multiespecíficas e combinações complexas de tais materiais. Uma proteína biologicamente ativa é um subgrupo de um agente terapêutico biológico e inclui proteínas recombinantes e seus fragmentos ativos (incluindo moléculas de anticorpo).

[0149] Moléculas de anticorpo como aqui utilizadas incluem um anticorpo completo tendo comprimento inteiro pesado e cadeias leves ou um fragmento do mesmo e uma molécula compreendendo qualquer um dos mesmos, por exemplo um Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, anticorpos de domínio único (por exemplo, VH ou VL ou VHH), scFv, anticorpos bivalente, trivalente ou tetravalente, Bis-scFv, diacorpos, tricorpos, tetracorpos e fragmentos de ligação e epitopo de qualquer um dentre os supracitados (consultar, por exemplo, Holliger e Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1.126 a 1.136; Adair e Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209 a 217). Os métodos para criar e fabricar estes fragmentos de anticorpo são bem conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods,

216, 165 a 181). Outros fragmentos de anticorpo para uso na presente invenção incluem os fragmentos Fab e Fab' descritos nos pedidos de patente internacionais nº WO2005/003169, WO2005/003170 e WO2005/003171. Os anticorpos multivalentes podem compreender múltiplas especificidades, por exemplo, biespecíficas ou podem ser monoespecíficos (consultar, por exemplo, WO92/22853 e WO05/113605). As variantes de anticorpos biespecíficos e multiespecíficos são especialmente consideradas neste exemplo, uma vez que o objetivo é neutralizar duas proteínas-alvo independentes. As regiões variáveis dos anticorpos aqui divulgados podem ser configuradas de modo a produzir uma única variante de anticorpo que seja capaz de se ligar e neutralizar dois antígenos-alvo.

[0150] Anticorpo e seus fragmentos de ligação, em particular pequenos fragmentos de anticorpo, tais como anticorpos de domínio, VHs, Fvs de cadeia simples (scFvs), ds-scFv e dsFv, podem ser entregues utilizando intracelularmente a presente tecnologia.

[0151] Em uma modalidade o anticorpo ou seu fragmento de ligação é um inibidor do ponto de verificação, por exemplo um anti-DP-1 ou inibidor de anti-PD-L1.

[0152] Em uma modalidade a molécula de anticorpo é humana ou humanizada.

[0153] Uma toxina é uma substância venenosa, especialmente derivada de uma fonte natural, em particular, uma proteína. Muitas toxinas, como a caliqueamicina, são usadas na terapia do câncer. Além disso, agentes quimioterapêuticos podem ser considerados tóxicos (ou toxinas). Assim, a definição de toxina se sobrepõe a outras definições aqui contidas. No entanto, neurotoxinas como veneno de cobra são toxinas, mas não quimioterápicas. No entanto, aqueles versados na técnica estão familiarizados com essas definições técnicas e são capazes de entender o significado do contexto da presente divulgação.

[0154] O diagnóstico, conforme utilizado aqui, é um agente usado em análises ou imagens para diagnosticar, rotular ou monitorar ou entender um status de doença. Um diagnóstico geralmente compreende uma molécula repórter, como um marcador ou similar que pode ser visualizado, medido ou monitorado de alguma forma.

[0155] Os radionuclídeos adequados para utilização na presente descrição incluem tálio-201, tecnécio-99m, Iodo-123, Iodo 131, Iodo-125, Flúor-18 e Oxigênio-15.

[0156] Além disso, é de particular interesse o uso do componente de GLA para fornecer intracorporeos, por exemplo, via fusões GLA, por exemplo, em que o intracorporeo é fundido ao terminal N ou C do componente de GLA. Os intracorporeos são capazes de atingir antígenos intracelulares.

[0157] Em uma modalidade os anticorpos que interagem e inibem RAS ou proteínas na via de sinalização RAS são utilizados na carga útil. Os genes *RAS* constituem uma família multigênica que inclui *HRAS*, *NRAS* e *KRAS*. As proteínas RAS são pequenas GTPases ligadas ao nucleotídeo de guanosina que funcionam como um hub de sinalização crítico dentro da célula. A via RAS/MAPK tem sido estudada extensivamente no contexto da oncogênese, pois sua desregulação somática é uma das principais causas de câncer. O RAS é somaticamente mutado em aproximadamente 20% das neoplasias (Bos JL, Cancer Res. 49: 4.682 a 4.689, 1989). Neste caso particular, prevê-se que, por exemplo, o componente de GLA é fusível a um intracorporeo RAS (descrito em Cetin M *et al.*, J Mol Biol. 429:... 562 a 573, 2017).

[0158] Apoptose tal como aqui utilizado é via de morte celular que ocorre como parte normal e controlada de um organismo de crescimento. A morte celular por apoptose é menos prejudicial para o tecido circundante que mecanismos de morte celular, como a necrose.

[0159] Necrose, como utilizada aqui, é a morte celular por doença ou lesão. Ela libera citocinas e fatores no tecido circundante que

podem danificar as células circundantes. Gangrena é um exemplo de morte celular necrótica.

AGENTES QUIMIOTERAPÊUTICOS

[0160] Agente quimioterapêutico e quimioterapia ou agente citotóxico são utilizados alternadamente aqui, a menos que o contexto indique o contrário.

[0161] A quimioterapia conforme utilizada aqui se refere a agentes químicos antineoplásicos específicos ou fármacos que são "seletivamente" destrutivos para células e tecidos malignos, por exemplo, agentes alquilantes, antimetabólitos, incluindo inibidores da timidilato sintase, antraciclinas, agentes antimicrotúbulos incluindo alcaloides de plantas, inibidores de topoisomerase, inibidores de PARP e outros agentes antitumorais. Seletivamente, neste contexto, é usado livremente, porque é claro que muitos desses agentes têm efeitos colaterais graves.

[0162] A dose preferida pode ser escolhida pelo praticante com base na natureza do câncer sendo tratado.

[0163] Exemplos de agentes alquilantes, que podem ser utilizados no método da presente invenção incluem um agente de alquilaçãomostarda nitrogenado, nitrosoureas, tetrazinas, aziridinas,, platinas e derivados, e agentes alquilantes não clássicos.

[0164] Exemplo de um agente quimioterapêutico contendo platina (também chamado de platinas), como cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, satraplatina, picoplatina, nedaplatina, triplatina e lipoplatina (uma versão lipossomal de cisplatina), em particular cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.

[0165] A dose para cisplatina está na faixa de cerca de 20 a cerca de 270 mg/m², dependendo do câncer exato. Frequentemente, a dose está na faixa de 70 a 100mg/m².

[0166] As mostardas de nitrogênio incluem mecloretamina, ciclofosfamida, melfalano, clorambucil, ifosfamida e busfalano.

[0167] Nitrosureias incluem N-Nitroso-N-metilureia (MNU), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) e semustina (MeCCNU), fotemustina e estreptozotocina. Tetrazinas incluem dacarbazina, mitozolomida e temozolomida.

[0168] Aziridinas incluem tiotepa, mitomicina e diaziquona (AZQ).

[0169] Exemplos de antimetabolitos, que podem ser utilizados no método da presente divulgação, incluem antifolatos (por exemplo metotrexato e pemetrexed), análogos da purina (por exemplo tiopurinas, como azatiopurina, mercaptopurina, tiopurina, fludarabina (incluindo a forma de fosfato), pentostatina e cladribina), análogos de pirimidina (por exemplo, fluoropirimidinas, como 5-fluorouracil e pró-fármacos das mesmas tal como capecitabina [Xeloda®]), floxuridina, gemcitabina, citarabina, decitabina, raltitrexed (Tomudex) cloridcamundongo, cladribina e 6-azauracilo.

[0170] Exemplos de antraciclinas, que podem ser utilizadas no método da presente divulgação, incluem daunorubicina (Daunomicina), daunorubicina (lipossomal), doxorubicina (adriamicina), doxorubicina (lipossomal), epirubicina, idarrubicina, valrubicina atualmente usado apenas para tratar câncer da bexiga e mitoxantrona um análogo de antraciclina, em particular doxorubicina.

[0171] Exemplos de agentes antimicrobianos, que podem ser empregados no método da presente revelação, incluem alcaloides de vinca e taxanos.

[0172] Alcaloides da vinca incluem produtos químicos completamente naturais, por exemplo, vincristina e vinblastina e também alcaloides da vinca semissintéticos, por exemplo vinorelbina, vindesina e vinflunina.

[0173] Taxanos incluem paclitaxel, docetaxel, abraxane, carbazitaxel e derivados dos mesmos. Os derivados de taxanos, tal como aqui utilizados, incluem reformulações de taxanos como taxol, por exemplo, em uma fórmula micelar, os derivados também incluem derivados químicos em que a química sintética é utilizada para modificar um material de partida que é um taxano.

[0174] Os inibidores de topoisomerase, que podem ser utilizados em um método da presente divulgação, incluem inibidores de topoisomerase tipo I, inibidores de topoisomerase tipo II e venenos de topoisomerase tipo II. Os inibidores do tipo I incluem topotecano, irinotecano, indotecano e indimitecano. Os inibidores de tipo II incluem genisteína e ICRF 193, que tem a seguinte estrutura:

[0175] Venenos Tipo II incluem amsacrina, etoposido, etoposido fosfato, teniposido e doxorrubicina e fluoroquinolonas.

[0176] Em uma modalidade, o quimioterápico é um inibidor de PARP.

MARCADORES

[0177] Em uma modalidade, a carga útil compreende um marcador fluorescente, um marcador quimioluminescente, um marcador de rádio, uma enzima, um corante ou um ligante.

[0178] Um marcador de acordo com a presente divulgação é definido como qualquer fração que pode ser detectada usando um ensaio. Exemplos não limitativos de moléculas repórter incluem enzimas, radiomarcadores, haptenos, marcadores fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminescentes, cromóforos, moléculas de fotoafinidade, partículas ou ligantes coloridos, como biotina.

[0179] Conjugados de marcadores são geralmente preferenciais para utilização como agentes de diagnóstico. Os agentes de diagnóstico geralmente se enquadram em duas classes, aqueles para uso em diagnósticos *in vitro* e aqueles para uso *in vivo* em protocolos de diagnóstico,

geralmente conhecidos como “imagens direcionadas”. Muitos agentes de imagem apropriados são conhecidos na técnica, assim como os métodos para sua ligação a peptídeos e polipeptídeos (ver, por exemplo, as patentes US 5.021.236, 4.938.948 e 4.472.509). As porções de imagem utilizadas podem ser íons paramagnéticos, isótopos radioativos, fluorocromos, substâncias detectáveis por RMN e agentes de imagem de raios-X.

[0180] No caso de íons paramagnéticos, pode-se mencionar a título de exemplo, íons, tais como o cromo (III), manganês (II), ferro (III), ferro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodímio (III), samário (III), itérbio (III), gadolínio (III), vanádio (II), térbio (III), disprósio (III), hólmio (III) e/ou érbio (III), sendo particularmente preferido o gadolínio. Os íons úteis em outros contextos, como a radiografia, incluem, mas não são limitados a, lantânio (III), ouro (III), chumbo (II) e, principalmente, bismuto (III).

[0181] No caso de isótopos radioativos para aplicação terapêutica e/ou de diagnóstico, pode-se mencionar astatina²¹¹, ¹⁴carbono, ⁵¹cromo, ³⁶cloro, ⁵⁷cobalto, ⁵⁸cobalto, cobre⁶⁷, ¹⁵²Eu, gálio⁶⁷, ³hidrogênio, iodo¹²³, iodo¹²⁵, iodo¹³¹, índio¹¹¹, ⁵⁹ferro, ³²fósforo, rênio¹⁸⁶, rênio¹⁸⁸, ⁷⁵selênio, ³⁵enxofre, tecnécio^{99m} e/ou ítrio⁹⁰. ¹²⁵I é adequado para uso em certas modalidades, e o tecnécio^{99m} e/ou índio¹¹¹ são particularmente adequados devido à sua baixa energia e adequação para detecção de longo alcance. Os peptídeos e polipeptídeos marcados radioativamente podem ser produzidos de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, peptídeos e polipeptídeos podem ser iodados por contato com iodeto de sódio e/ou de potássio e um agente oxidante químico, como hipoclorito de sódio, ou um agente oxidante enzimático, como lactoperoxidase. Os peptídeos podem ser marcados com tecnécio^{99m} por processo de troca de ligantes, por exemplo, reduzindo pertecnato com solução estanosa, quelando o tecnécio reduzido em uma coluna Sephadex e aplicando o peptídeo a esta coluna. Alternativamente, podem ser utilizadas técnicas de marcação direta, por exemplo, incubação de pertecnato, um agente redutor como SnCl_2 , uma solução tampão como solução de ftalato de

sódio-potássio, e o peptídeo. Grupos funcionais intermediários que são frequentemente usados para ligar radioisótopos que existem como íons metálicos ao peptídeo são o ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) ou o ácido etileno diaminotetracético (EDTA).

[0182] Os marcadores fluorescentes adequados para uso como cargas úteis incluem Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, Isotiocianato de Fluoresceína, HEX, 6-JOE, Oregon Verde 488, Oregon Verde 500, Oregon Verde 514, Azul Pacífico, REG, Verde de Rodamina, Vermelho de Rodamina, Renografina, ROX, TAMRA, TET, Tetrametilrodamina e/ou Vermelho Texas.

[0183] Outro tipo de carga útil é o adequado para uso *in vitro*, em que um peptídeo está ligado a um ligante de ligação secundária e/ou a uma enzima (uma etiqueta enzimática) que gera um produto colorido em contato com um substrato cromogênico. Exemplos de enzimas adequadas incluem urease, fosfatase alcalina, hidrogênio peroxidase (rábano silvestre) ou glicose oxidase. Os ligantes de ligação secundária preferidos são compostos de biotina e avidina e estreptavidina. A utilização de tais marcadores é bem conhecida dos especialistas na técnica e é descrita, por exemplo, nas Patentes US 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 e 4.366.241.

[0184] Outros métodos são conhecidos na técnica para a fixação e para a ligação de um peptídeo a sua porção conjugada. Alguns métodos de fixação envolvem o uso de um complexo de quelato metálico que utiliza, por exemplo, um agente quelante orgânico, como um anidrido do ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA); ácido etilenotriaminotetraacético; N-cloro-p-toluenossulfonamida; e/ou tetracoloro-3 α -6 α -difenilglicouril-3 ligado ao anticorpo (Patentes dos EUA 4.472.509 e 4.938.948). Os peptídeos ou polipeptídeos também podem reagir com uma enzima na presença de um agente

de acoplamento, como glutaraldeído ou periodato. Os conjugados com marcadores de fluoresceína são preparados na presença desses agentes de acoplamento ou por reação com um isotiocianato.

[0185] Em uma modalidade, o marcador é capaz de manchar ou marcar o núcleo de uma célula-tronco.

VÍRUS ADEQUADOS PARA USO COMO CARGAS ÚTEIS NA PRESENTE DIVULGAÇÃO

[0186] Em uma modalidade, o vírus utilizado na presente divulgação é um vírus envelope, por exemplo, selecionado a partir de um vírus do herpes (tal como herpes simplex 1), um poxvírus (por exemplo, vírus vaccinia), um hepadnavírus, uma flavivírus, um togavírus, coronavírus, hepatite D, ortomixovírus, paramixovírus (tais como o do sarampo ou vírus da doença de Newcastle), rabdovírus, bunyavirus, filovírus, eRhabdoviridae (tais como vírus Indiana da estomatite vesicular (VSV)).

[0187] Em uma modalidade, o vírus utilizado na presente divulgação é um vírus não envelope, por exemplo, selecionado a partir de adenoviridae (tal como um adenovírus), papilomaviridae, picornaviridae (como vírus coxsackie ou vírus Seneca Valley (por exemplo, Senecavírus)), reovírus.

[0188] Em uma modalidade, o vírus é um adenovírus, por exemplo, um adenovírus humano, como o selecionado de um vírus do grupo B (em particular Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 ou uma quimera do mesmo, tal como Enadenotucirev), um vírus do grupo C (em particular Ad1, 2, 5, 6 ou uma quimera do mesmo), um vírus do grupo D (em particular Ad8, Ad10, Ad13, Ad15, Ad17, Ad19, Ad20, Ad22, Ad30, Ad32, Ad33, Ad36, Ad37, Ad38, Ad39, Ad42, Ad43, Ad44, Ad45, A46, Ad47, Ad48, Ad49, Ad50 ou uma quimera do mesmo), um vírus do grupo E (em particular Ad4), um vírus do grupo F (em particular Ad40, Ad41 ou uma quimera do mesmo) e uma quimera de dois ou mais dos vírus do grupo B, C, D, E ou F.

[0189] A grande maioria dos vírus têm proteínas associadas com o reconhecimento da célula alvo e absorção bem descritos. A modificação de seu tropismo para redirecionar ou permitir um alvejamento mais seletivo para tumores em vírus oncolíticos pode ser introduzida usando os métodos descritos na rev. em Verheije e Rottier, *Adv. Virology* 2012: 798526, 2012.

[0190] Proteínas adicionais da superfície celular viral não envolvidas no alvejamento viral nativo podem ter motivos de alvejamento projetados para eles (por exemplo, proteína IX de revestimento secundário de Ad virion IX Salisch *et al.*, *PLoS One* 12: e0174728, 2017).

[0191] Vírus envelope têm uma membrana exterior (envelope), que cobre o capsídeo do vírus. O envelope é tipicamente derivado das porções das membranas das células hospedeiras (fosfolipídios e proteínas), mas também inclui algumas proteínas virais. As glicoproteínas na superfície do envelope servem para identificar e se ligar aos locais receptores na membrana do hospedeiro. O envelope viral, em seguida, funde-se com a membrana do hospedeiro, permitindo que a capsídeo viral e genoma entrem e infectem o hospedeiro.

[0192] Vários vírus oncolíticos são divulgados em WO2014/13834, aqui incorporada por referência.

[0193] O vírus herpes simplex (HSV) entra nas células por meio de quatro glicoproteínas essenciais - gD, gH/gL, gB, ativadas de um modo em cascata por gD que se ligam a um dos seus receptores, nectina1 e HVEM. O novo alvejamento do HSV foi alcançado pela inserção de ligantes e scFvs na proteína gC e/ou gD ou gH (Campadelli-Fiume, G *et al.*, *Rev. Em Med Virol* 21: 213 a 226, 2011, Gatta, V *PLoS Pathog* 11: e1004907, 2015). Os vetores do vírus do herpes simplex oncolítico tipo 1 foram desenvolvidos para uso clínico. Esses vírus são competentes para replicação e têm mutações nos genes que afetam a replicação viral, neuropatogenicidade e evasão imunológica, e por exemplo incluem vírus de primeira geração, como NV1020 (R7020), *d/sptk*,

d18.36tk, hrR3, R3616, 1716, vírus de segunda geração como G207 (MGH-1), 3616UB, SUP, NV1023, vírus de terceira geração como G47Δ, vetores de expressão transcricionais como G92A, d12.CALP, Myb34.5, vetores de expressão de transgene como rRP450 e outros vírus como o Talimogene laherparepvec (T-Vec). Acredita-se que os vetores HSV-1 são úteis no tratamento de uma grande variedade de tumores sólidos, por exemplo, incluindo câncer de glioma, melanoma, mama, próstata, cólon, ovário e pâncreas. O vírus HSV-1 infecta uma ampla variedade de tipos e espécies de células, é citolítico por natureza, o ciclo de vida replicativo do vírus resulta na destruição da célula hospedeira, possui um genoma bem caracterizado e grande (152K), mas contém muitos genes essenciais que fornecem até 30K de espaço para a inserção de genes terapêuticos. Geralmente, os vírus HSV não são mutados no gene da timidina quinase por razões de segurança. O Talimogene laherparepvec é um vírus de herpes oncolítico aprovado para uso no tratamento de melanoma. Outros vírus de herpes básicos incluem G207, SEPREHVIR (HSV-1716), pela Virttu Biologics, mutante HSV-1 R3616, mutante HSV-1 1716, NV1020 (R7020), mutante R3616 (*RL1* excluído), mutante KM100 tem inserções no *UL48* (codifica a proteína do tegumento transativador pUL48 [VP16]) e os genes *RL2*, *G92A*, mutantes, *Myb34.5* e *rQNestin34.5*.

[0194] **Poxvírus** - vírus Vaccinia, como Vaccinia Ancara Modificado (MVA) pode ser utilizado (Galmiche MC et al., J Gen Virol 78: 3019-3027, 1997), MVA pode ser substituído por uma molécula de fusão p14 que transporta um scFv inserido dirigido contra o antígeno associado ao tumor MUC-1 (Paul, S et al., Viral Immunol 20: 664-671, 2007) Ver também rev. em Liang L et al., Viruses 6: 3787-3808, 2014, Hsiao JC et al., J. Virol 73: 8750-8761, 1999, rev. em Chen TL e Roffler S, Med Res. Rev. 28: 885-928, 2008 e Kinoshita T et al., J. Biochem 144: 287-294, 2008. JX-594, por Jennerex, é um vírus Vaccinia deletado por timidina quinase mais GM-CSF. GL-ONC1 é um vírus Vaccinia atenuado (tensão Lister), que provoca regressão de eliminação e uma vasta gama de tumores sólidos em modelos pré-clínicos de camundongo.

[0195] **Paramixovírus** (tais como as do sarampo ou vírus da doença de Newcastle),

[0196] O vírus do sarampo (MeV) é um vírus de RNA de fita simples, com sentido negativo, envelopado (não segmentado), do gênero Morbillivirus, dentro da família Paramyxoviridae. O vírus do sarampo tem duas glicoproteínas envelope: a proteína de ligação hemaglutinina (H) e proteína de fusão (F). A ligação, entrada e subsequente fusão célula-célula é mediada através de 2 receptores de sarampo, CD46 e a molécula de ativação de linfócitos sinalizadores (SLAM). Conferir, por exemplo, rev. em Msaouel P et al., *Methods Mol Biol* 797: 141-162, 2012, Robinson S. e Galanis, E. *Expert Opin Biol Ther*. 17: 353-363, 2017, Aref S et al., *Viruses* 8. Pii: E294, 2016); (rev. em Chen TL e Roffler S, *Med Res. Rev.* 28: 885-928, 2008 e Kinoshita T et al., *J Biochem* 144: 287-294, 2008) e (Russell SJ e Peng KW, *Curr Topic Microbiol. Immunol* 330: 213-241, 2009, Robinson S e Galanis, E *Expert Opin Biol. Ther* 17: 353-363, 2017, Aref S et al., *Viruses* 8. Pii: E294, 2016). O vírus do sarampo que codifica o simulador de iodeto de sódio tireoidiano humano ou MV-NIS é uma cepa oncolítica de Edmonston (Ed) do vírus do sarampo. A imagem radioativa de iodo fornece uma nova técnica para o monitoramento da expressão do gene NIS.

[0197] Vírus da doença de Newcastle pode também ser utilizado.

[0198] Os adenovírus **Adenoviridae** estão entre os vírus mais extensivamente estudados, sendo utilizados como agentes oncolíticos. Uma matriz de peptídeos e proteínas foi projetada em proteínas virais associadas ao virion para alterar o tropismo nativo do vírus (rev. Em Verheije MH e Rottier PJM *Adv Virol* 2012: 798526, 2012). No entanto, tudo isso depende da montagem viral no núcleo, o que apresenta desafios significativos.

[0199] Outros vírus sem envelope incluem Cocksackievirus, Poliovírus e Reovírus. Conferir, por exemplo, rev. em Altan-Bonnet, N, *Curr Opin Microbiol* 32: 77-81, 2016 e Chen YH et al., *Cell* 160: 619-630, 2015, rev. em Chen TL e Roffler S, *Med Res. Rev.* 28: 885-928, 2008 e

Kinoshita T et al., J. Biochem 144: 287-294, 2008 e rev. em Verheije MH e Rottier PJM Adv Virol 2012: 798526, 2012).

[0200] Existem numerosos adenovírus por exemplo, Ad5 -YCD/mutTKSR39rep-hIL12, tais como para o tratamento do câncer da próstata foi iniciado, CGTG-102 (Ad5/3-D24-GMCSF), por Oncos Therapeutics, por exemplo para o tratamento de sarcomas de tecidos moles, Oncorine (H101), CG0070, Enadenotucirev (EnAd) WO2005/118825, OvAd1 e OvAd2 divulgados em WO2008/080003, ONCOS-102, por exemplo, para ressecável mesotelioma pleural maligno, e DNX-2401, por exemplo, para glioma.

[0201] Cavatak é onome comercial para uma preparação de Coxsackievirus A21 de tipo selvagem, útil no tratamento do melanoma maligno. Vírus Seneca Valley (NTX-010) e (SVV-001), por exemplo para câncer de pulmão de pequenas células e neuroblastoma

[0202] **Reovírus- REOLYSIN®** (pelareorep; Reovírus de Tipo Selvagem; Serotipo 3 Dearing; Oncolytics Biotech), por exemplo para o tratamento de vários cânceres e patologias proliferativas celulares.

[0203] **Vírus da Estomatite Vesicular (VSV)** VSV é outro vírus envelopado a ser explorado como no agente oncolítico. Ver, por exemplo, Betancourt D et al., J Virol 89: 11786-11800, 2015) e rev. em Hastie E e Grdzlishvili VZ J. Gen Virol 93: 2529-2545, 2012).

PROTEÍNAS CODIFICADAS POR UM VÍRUS

[0204] Em uma modalidade, um vírus ou vetor utilizado no método da presente divulgação compreende um transgene, por exemplo, onde o transgene deve substituir o material genético defeituoso na célula, para fornecer uma função nova ou aumentada na célula, sensibilizar a célula para o tratamento, bloquear uma função na célula ou expressar uma proteína ou peptídeo terapêutico.

[0205] Em uma modalidade, o vírus utilizado como carga útil de acordo com as presentes divulgações, compreende um transgene ou transgenes, por exemplo, codificando um agente selecionado

independentemente a partir de uma sequência de RNAi, uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo (por exemplo, uma molécula de anticorpo ou seu fragmento de ligação, uma quimiocina, uma citocina, um imunomodulador, um marcador fluorescente ou uma enzima).

[0206] Isso inclui, mas não se limita a, formatos únicos que mostraram promessa pré-clínica, mas carecem de meios eficazes e econômicos para a entrega de, por exemplo, peptídeos, intracorporos e estruturas alternativas (rev. in Boldicke T, Protein Sci 26: 925-945, 2017, Marschall e Dubel, Comput Struct Biotechnol J 14: 304-308, 2016, Miersch e Sidhu F1000Res 5.pii.F1000 Faculty Rev. 1947, 2016, Peptides, Tsomaia Eur J Med Chem 94:459-470, 2015, Marschall ALJ et al, Mabs 7: 1010-1035, 2015, AlDeghaither D et al., J Clin Pharmacol. 55: S4–S20, 2015))) e inclui agentes com efeitos terapêuticos nas células tumorais, células-tronco tumorais, endotélio associado ao tumor e estroma associado ao tumor. De especial interesse são moléculas que podem servir a múltiplas funções, por exemplo, como terapêuticas, biomarcadores e/ou diagnósticos. O gene da timidina quinase do vírus herpes simplex (HSV-TK) é uma enzima de conversão pró-fármaco bem estabelecida com um pró-fármaco clinicamente aprovado (ganciclovir-GCV), ver, por exemplo, Holder et al., Cancer Res. 53: 3475-3485, 1993, Touraine RL et al., Gene Therapy 5: 1705-1711, 1998),

[0207] Além disso, a expressão da proteína cinase de timidina pode também ser explorado para a imagem e controlar a atividade do viroterapia durante o curso do tratamento. A tomografia por emissão de pósitrons e a tomografia computadorizada por emissão de fóton único são métodos rotineiramente usados para a detecção e o monitoramento de câncer e terapias contra o câncer e são meios viáveis para detectar a expressão da proteína timidina quinase quando um substrato de timidina quinase é administrado (Wang JQ et al., Bioorg Med Chem 13: 549-556, 2005, Tjuvajev JG et al., J. Nucl Med 43: 1072-1083, 2002). Alternativamente, o gene NIS pode ser usado e tem sido explorado como um agente para fins diagnósticos e

terapêuticos em vírus oncolíticos, assim como a TK (Miller A e Russell S Expert Opin Biol Ther 16: 15-32, 2016, Ravera S et al., Annu Rev Physiol 79: 261-289, 2017, Portulano et al., Endocr Rev. 35: 106-149, 2014).

[0208] Em uma modalidade, os anticorpos que interagem e inibem o RAS ou proteínas na via de sinalização do RAS são codificados no vírus da presente divulgação, por exemplo, como proteína de fusão com o componente de GLA. Os genes *RAS* constituem uma família multigênica que inclui *HRAS*, *NRAS* e *KRAS*. Ver, por exemplo, Bos JL, Cancer Res. 49: 4682-4689, 1989; e Cetin M et al., J Mol Biol. 429: 562-573, 2017.

TERAPIA COMBINADA

[0209] Em uma modalidade, o componente de GLA é utilizado em combinação com uma segunda terapia, por exemplo uma terapia anticâncer. Esta é uma terapia administrada separadamente ao componente de GLA (isto é, não está vinculado ao componente de GLA).

[0210] Em uma modalidade, uma combinação de agentes quimioterapêuticos utilizados é um quimioterápico aqui descrito, por exemplo, uma platina e 5-FU ou um pró-fármaco do mesmo, por exemplo cisplatina ou oxaplatina e capecitabina ou gemcitabina, como FOLFOX.

[0211] Em uma modalidade, a quimioterapia compreende a combinação de agentes de quimioterapia, em particular agentes quimioterapêuticos citotóxicos.

[0212] Em uma modalidade, a combinação quimioterapia compreende uma platina, tais como cisplatina e fluorouracilo ou capecitabina.

[0213] Em uma modalidade, a combinação de quimioterapia em capecitabina e oxaliplatina (Xelox).

[0214] Em uma modalidade, a quimioterapia é uma combinação de ácido folínico e 5-FU, opcionalmente em combinação com oxaliplatina.

[0215] Em uma modalidade, a quimioterapia é uma combinação de ácido folínico, 5-FU e irinotecano (FOLFIRI), opcionalmente em combinação com oxaliplatina (FOLFIRINOX). O regime consiste em: irinotecano (180 mg/m² IV em 90 minutos) simultaneamente com ácido folínico (400 mg/m² [ou 2 x 250 mg/m²] IV em 120 minutos); seguido de fluorouracil (bolus IV de 400 a 500 mg/m²) e depois fluorouracil (2400 a 3000 mg/m² de infusão intravenosa por 46 horas). Esse ciclo geralmente é repetido a cada duas semanas. As dosagens mostradas acima podem variar de ciclo para ciclo.

[0216] Em uma modalidade, a combinação de quimioterapia utiliza um inibidor de microtúbulos, por exemplo, sulfato de vincristina, epotilona A, N-[2-[(4-Hidroxifenil)amino]-3-piridinil]-4-metoxibenzenossulfonamida (ABT-751), um agente quimioterapêutico derivado de taxol, por exemplo paclitaxel, abraxane ou docetaxel ou uma combinação dos mesmos.

[0217] Em uma modalidade, a terapia de combinação utiliza um inibidor de mTOR. Exemplos de inibidores de mTor incluem: everolimus (RAD001), WYE-354, KU-0063794, papamicina (Sirolimus), Temsirolimus, Deforolimus (MK-8669), AZD8055 e BEZ235(NVP-BEZ235).

[0218] Em uma modalidade, a terapia de combinação utiliza um inibidor de MEK. Exemplos de inibidores de MEK incluem: AS703026, CI-1040 (PD184352), AZD6244 (Selumetinib), PD318088, PD0325901, AZD8330, PD98059, U0126-EtOH, BIX 02189 ou BIX 02188.

[0219] Em uma modalidade, a terapia de combinação utiliza um inibidor de AKT. Exemplos de inibidores de AKT incluem: MK-2206 e AT7867.

[0220] Em uma modalidade, a combinação utiliza um inibidor de aurora quinase. Exemplos de inibidores da aurora quinase incluem: Inibidor I da Aurora A, VX-680, AZD1152-HQPA (Barasertib), Mesilato SNS-314, PHA-680632, ZM-447439, CCT129202 e Hesperadin.

[0221] Em uma modalidade, a terapia de combinação utiliza um inibidor de p38, por exemplo, como divulgado no documento WO2010/038086, como *N*-[4-({4-[3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H* -pirazol-5-il)ureido]naftaleno-1-iloxi} metil) piridin-2-il]-2-metoxiacetamida.

[0222] Em uma modalidade, a combinação utiliza um inibidor de Bcl-2. Exemplos de inibidores de Bcl-2 incluem: mesilato de obatoclax, ABT-737, ABT-263 (navitoclax) e TW-37.

[0223] Em uma modalidade, a terapia de combinação compreende um inibidor do ponto de verificação, para um inibidor anti-DP-1 ou um inibidor anti-PD-L1.

[0224] Em uma modalidade, a combinação de quimioterapia compreende um antimetabólito, como capecitabina (xeloda), fosfato de fludarabina, fludarabina (fludara), decitabina, raltitrexedo (tomudex), cloridcamundongo de gemcitabina e cladribina.

[0225] Em uma modalidade, a combinação de quimioterapia compreende ganciclovir que pode auxiliar no controle das respostas imunológicas e/ou da vascularização do tumor.

[0226] Em uma modalidade, a quimioterapia inclui um inibidor de PARP.

[0227] Em uma modalidade, a terapia de combinação inclui um inibidor do metabolismo de câncer com a inibição específica da atividade da enzima DHODH.

[0228] Em uma modalidade, uma ou mais terapias utilizadas no método no presente documento são metronômicas, isto é, um tratamento contínuo ou frequente com baixas doses de fármacos anticancerosos, frequentemente, administrados concomitantemente com outros métodos de terapia.

[0229] Em uma modalidade, é fornecido o uso de múltiplos ciclos de tratamento (como quimioterapia) por exemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

[0230] Em uma modalidade, a quimioterapia é utilizada em um ciclo de 28 dias.

[0231] Em uma modalidade, as moléculas da presente divulgação são fornecidas em uma composição farmacêutica que compreende um excipiente, diluente e/ou transportador. Em uma modalidade, a composição é como uma formulação parenteral.

[0232] A formulação parenteral significa uma formulação projetada para não ser entregue através do trato gastrointestinal. As rotas de entrega parenterais típicas incluem injeção, implantação ou infusão.

[0233] Em uma modalidade, a formulação parenteral está na forma de uma injeção. A injeção inclui injeção intravenosa, subcutânea, intracranial, intratecal, intratumoral ou intramuscular. Injeção, conforme utilizado no presente documento, significa a inserção de líquido no corpo através de uma seringa.

[0234] Em uma modalidade, a formulação parenteral está na forma de uma infusão.

[0235] Infusão, conforme utilizado no presente documento, significa a administração de fluidos a uma taxa mais lenta por gotejamento, bomba de infusão, acionador de seringa ou dispositivo equivalente. Em uma modalidade, a infusão é administrada ao longo de um período na faixa de 1,5 minuto a 120 minutos, tal como cerca de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 ou 115 minutos.

[0236] Em uma modalidade, a formulação é para administração intravenosa (iv). Essa via é particularmente eficaz porque permite o acesso rápido à maioria dos órgãos e tecido e é particularmente útil para o tratamento de metastases, por exemplo, metastases estabelecidas, especialmente aquelas localizadas em regiões altamente vascularizadas, tais como o fígado e pulmões.

[0237] As formulações terapêuticas serão tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra formulação parenteral adequada para administração a um humano e pode ser formulada como um dispositivo preenchido, tal como uma seringa ou frasco, particular como uma dose única.

[0238] Como discutido acima, a formulação compreenderá geralmente um diluente ou carreador farmacologicamente aceitável, por exemplo, um carreador isotônico não tóxico que seja compatível com o vírus e no qual o vírus seja estável durante o período de tempo requerido.

[0239] O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão que contém, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e semelhantes) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, com uso de um dispersante ou tensoativo, como a lecitina ou um tensoativo não iônico, como o polissorbato 80 ou 40. Em dispersões, a manutenção do tamanho de partícula exigido pode ser assistida pela presença de um tensoativo. Os exemplos de agentes isotônicos incluem açúcares, polióis, tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição.

[0240] Em uma modalidade, é fornecido um kit de peças compreendendo um componente de GLA de acordo com a presente divulgação e uma carga útil, em que a carga útil está ligada ou desvinculada ao referido componente de GLA.

[0241] “Compreendendo” no contexto da presente especificação pretende significar “incluindo”.

[0242] Quando tecnicamente apropriado, as modalidades da invenção podem ser combinadas.

[0243] As modalidades são aqui descritas como compreendendo certas características/elementos. A divulgação também se

estende a modalidades separadas consistindo ou consistindo essencialmente nas referidas características/elementos.

[0244] Referências técnicas tais como patentes e aplicações são incorporadas ao presente documento a título de referência.

[0245] Os antecedentes técnicos fazem parte da divulgação técnica da presente especificação e podem ser usados como base para emendas porque a discussão nela não se limita a discutir a técnica anterior, pois também inclui uma discussão sobre os problemas técnicos encontrados no campo e na aplicação da presente tecnologia.

[0246] Quaisquer modalidades recitadas especificamente e explicitamente no presente documento podem formar a base de uma declaração de responsabilidade, isoladamente ou em combinação com uma ou mais modalidades adicionais.

[0247] O presente pedido reivindica prioridade a partir de números de série dos Estados Unidos: 62/554530, 62/569,403, 62/554533, 62/569,411, 62/584,565 e 62/593,014. Cada um desses pedidos é incorporado por referência. Essas aplicações podem ser utilizadas como base para uma correção na presente especificação.

[0248] A invenção será agora descrita com referência aos exemplos seguintes, que são meramente ilustrativos e não devem de modo algum ser interpretados como limitativos do âmbito da presente invenção.

EXEMPLOS

[0249] **Figura 1A-D** Mostra várias representações das estruturas de proteína GLA.

[0250] **Figura 1E** Mostra uma modalidade de um componente de GLA de acordo com a presente divulgação.

[0251] **Figura 2** Mostra a coloração com proteína S (PrS) e anexina de linhas celulares de câncer de mama tratadas com peróxido para induzir apoptose. **A**, células MDA-231 humanas tratadas com peróxido e coradas com FITC-PrS. **B**, células MDA-231 não tratadas coradas como em A.

C, células MDA-231 tratadas coradas com anexina. **D**, células MCF-7 humanas tratadas com peróxido e coradas com PrS. **E**, células MET-1 murinas, como em **D**. **F**, células 4T1 murinas, como em **D**.

[0252] **Figura 3** Mostra a localização celular sobreposta, ainda que distinta, de PrS e anexina. **A**, células murinas 4T1 tratadas com peróxido e coradas com Cy5 PrS (**VERMELHO**) e FITC anexina (**VERDE**). Seta de luz, sinais colocalizados; setas vermelhas, células coradas com PrS e não anexinas; seta verde, coloração de células relativamente mais brilhante com anexina, mas menos brilhante com PrS, indicando padrões de ligação distintos (as inserções mostram manchas de PrS e anexina separadamente). **B**, células 4T1 tratadas coradas com FITC PrS e Cy5 anexina. Setas verdes, células coradas com PrS e não anexinas. **C**, coloração com Cy5 anexina de células 4T1 tratadas pré-incubadas com excesso de 1.000 vezes de anexina fria.

[0253] **Figura 4** Mostra coloração de células COS-1 apoptóticas com PrS e anexina. As células foram tratadas com t-BHP como descrito e coradas com anexina FITC (esquerda) e Cy5 PrS (direita). As setas indicam estruturas subcelulares presumidas como corpos apoptóticos.

[0254] **Figura 5** Mostra coloração diferencial de vesículas extracelulares com PrS e anexina. As vesículas extracelulares foram preparadas a partir de células 4T1 e coradas com FITC PrS (**VERDE**) e Cy5 anexina (**VERMELHO**). As setas indicam vesículas coradas apenas com anexina (seta **VERMELHA**), apenas PrS (seta **VERDE**) e ambas as proteínas (seta clara).

[0255] **Figura 6** Mostra a localização subcelular de PrS e anexina. **A**, **B**, células 4T1 apoptóticas foram coradas com FITC PrS (setas **VERDES**) e Cy5 anexina (setas **VERMELHAS**); setas claras, colocalização. **C**, Possíveis corpos apoptóticos.

[0256] **Figura 7** Mostra a internalização do PrS em 5 minutos. As células apoptóticas 4T1 foram coradas com FITC PrS (verde) e Cy5 anexina (vermelho) e fotografadas dentro de 10 minutos após a adição das proteínas. **A**, imagem mesclada. **B**, mancha nuclear Hoescht sozinha.

[0257] **Figura 8** Mostra imagens BLI de tumores 4T1 em camundongos.

[0258] **Figura 9** Imagem SPECT do efeito da doxorubicina em tumores 4T1, usando PrS radiomarcado e anexina. Camundongos com tumores de câncer de mama 4T1 foram fotografados com ^{99m}Tc PrS (A e B), ou anexina (C e D), antes (A e C) e 24 horas após a doxorubicina (B e D).

[0259] **Figura 10** Mostra a imagem SPECT de camundongos tratados com ciclo-hexamida. Cinco camundongos por painel são mostrados antes (**A e C**) e 24 horas após o tratamento (**B e D**). Os camundongos foram fotografados com ^{99m}Tc PrS (**A e B**) ou anexina (**C e D**). As setas indicam sinal hepático aumentado.

[0260] **Figura 11** Mostra a localização do Cy5 PrS no baço infectado. Camundongos CD1 foram infectados com *Listeria* bioluminescente e fotografados no dia 2 após a infecção. Os camundongos foram injetados com Cy5 PrS 30 minutos antes do sacrifício, e os baços foram removidos e congelados. São mostrados camundongos modestamente infectados (**A**) e de controle não infectados (**C**). São mostradas seções dos baços infectados (**B**) e não infectados (**D**) de cada camundongo no canal Cy5, fundidos com imagens de contraste de fase.

[0261] **Figura 12** Mostra a localização de Cy5 PrS para tumores tratados com doxorubicina. Os camundongos implantados com tumores de câncer de mama 4T1 foram tratados com doxorubicina (painéis da direita) ou deixados sem tratamento (painéis da esquerda). 24 horas depois, os camundongos foram injetados intravenosamente com Cy5 PrS e sacrificados 30 minutos depois. Os tumores foram removidos, congelados e seccionados para microscopia de fluorescência. São mostradas imagens de contraste mesclado Cy5/fase de quatro camundongos diferentes.

[0262] **Figura 13** Mostra diferenciação de TSCs. Os TSCs foram cultivados na presença (esquerda) ou ausência (direita) de

fatores de crescimento. As setas no painel direito indicam células gigantes características de diferenciação.

[0263] **Figura 14** Mostra coloração de PrS de células-tronco trofoblásticas e trofoblastos diferenciados. As células-tronco dos trofoblastos (esquerda) foram diferenciadas em células gigantes dos trofoblastos (direita) pela retirada dos fatores de crescimento. As células foram coradas com Cy5 PrS e fotografadas.

[0264] **Figura 15** Mostra a diferenciação MSC. As MSC foram tratadas como descrito no texto, para diferenciação em adipócitos (painéis superiores) ou osteoblastos (painéis inferiores). As células diferenciadas exibiram a morfologia esperada em cada caso.

[0265] **Figura 16** Mostra MSCs coradas com PrS (verde), anexina (vermelho) e Hoechst (azul). As células foram fotografadas dentro de 10 minutos após a adição da mistura de coloração.

[0266] **Figura 17** Mostra TSCs corados com PrS (verde, área mais clara), anexina (vermelho, luz ao redor da membrana celular) e Hoechst (azul). As células foram fotografadas dentro de 5 minutos após a adição da mistura de coloração.

[0267] **Figura 18** Mostra coloração diferencial das vesículas de TSC. Os TSCs foram corados como na **Figura 17**. O grupo de células está secretando grandes vesículas coradas com anexina (vermelha) e não com PrS (verde).

[0268] **Figura 19** Mostra a coloração com PrS das células progenitoras neurais C17.2. As células foram coradas com PrS-FITC e fotografadas com microscopia padrão (não confocal).

[0269] **Figura20** Mostra a internalização do PrS no TSC em 4C. FITC PrS (verde) e Cy5 anexina (vermelho) foram adicionados ao TSC a 4C e fotografados com microscopia confocal.

[0270] **Figura 21** Mostra células de coloração SCA-1/c-kit negativas para linhagem da medula óssea de camundongo. As

células não foram coradas com PI (iodeto de propídio; para detectar células mortas) ou PrS nesse ponto da análise. Ausência de coloração para linhagens hematopoiéticas (painel esquerdo) e coloração de c-kit e SCA1 (painel direito) define a população de HSC, mostrada em verde (áreas mais claras).

[0271] **Figura 22** Coloração PrS de HSC de longo prazo. Os HSC foram isolados como na Figura 1 e corados com FITC PrS. O padrão SLAM foi determinado com Cy7 (eixo x).

[0272] **Figura 23** Coloração PrS de HSC de curto prazo. Os HSC foram isolados como na Figura 1 e corados com FITC PrS. O padrão SLAM foi determinado com Cy7 (eixo x).

[0273] **Figura 24** Mostra a internalização do PrS no HSC de longo prazo. Os HSC foram preparados como descrito, corados para PrS e examinados com microscopia confocal. Verde (áreas mais claras), FITC PrS; coloração nuclear Hoescht azul; vermelho, PI. Observe que a coloração de PI é excluída do núcleo, indicando que as células estão vivas.

[0274] **Figura 25** Mostra um exemplo de HSC morto exibindo PI nuclear.

[0275] **Figura 26** A entrega mediada por GLA não é tóxica para as células.

[0276] Esta especificação também inclui as sequências 1 a 6, na lista de sequências associada.

[0277] Este projeto iniciou o teste das PRS recombinantes marcadas como um agente de imagem in vivo para SPECT (Single Photon Computed Tomography). Surpreendentemente, verificou-se que a molécula internalizou rapidamente em células apoptóticas. Essa descoberta inesperada levou a explorar ainda mais o fenômeno, e descobriu-se que a PrS também era internalizada em um subconjunto de células-tronco não apoptóticas de vários tipos.

[0278] PrS é o domínio de GLA da proteína S e o domínio de EGF da proteína S, como mostrado na SEQ ID NO: 6.

MÉTODOS

[0279] Para a fluorescência, conjugação de Cy5 e FITC foi conseguida utilizando kits de rotulagem da Amersham (GE Healthcare) e Molecular Probes (Invitrogen) respectivamente, de acordo com as instruções dos fabricantes. Ambos os kits fornecem colunas para a remoção de fluoróforo não conjugado. Inicialmente, 0,77 mg de PrS (Fração 2) em 1 ml e 0,77 mg de anexina em 1 ml foram marcados com FITC para testar a especificidade da ligação a células apoptóticas. Para estudos de colocalização e competição, 0,68 mg de PrS (Fração 3) em 1 ml e 0,68 mg de anexina foram marcados com Cy5. Para microscopia confocal, 0,76 mg de PrS da segunda remessa foram marcados com FITC e foi usada a anexina conjugada com Cy5 previamente marcada. Note-se que a eficiência precisa da rotulagem não foi determinada e a recuperação das colunas foi assumida em 85%, de acordo com as instruções dos fabricantes dos kits de rotulagem. Assim, a intensidade relativa de coloração das duas proteínas em qualquer caso pode refletir essas contingências. As células foram coradas por 30 minutos inicialmente, mas foi subsequentemente determinado que menos de 5 minutos eram suficientes. Para testar a PrS quanto à especificidade celular apoptótica, foram inicialmente utilizadas quatro linhas celulares de câncer de mama; MDA-231 e MCF7 humano e 4T1 e MET-1 murinos. Posteriormente, também foram utilizadas células renais de macaco COS-1. A apoptose foi induzida com peróxido de hidrogênio ou hidroperóxido de butil terciário (t-BHP). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços a 6×10^4 células por poço ou lâminas da câmara Eppendorf a 1×10^4 células por poço, e a apoptose foi induzida no dia seguinte, usando H_2O_2 2mM ou t-BHP para períodos de 30 minutos a 2 horas. Após a indução, os poços foram lavados com tampão de ligação à anexina (AB; Santa Cruz Biotech) e corados com proteína marcada. A partir de experiência passada e da literatura, 5,5 µg/ml de proteína anexina foram usadas para coloração. Esta quantidade foi ajustada para adição equimolar de PrS assumindo que os pesos moleculares da anexina sejam 36 kD e o PrS recombinante seja 30 kD, com base nas imagens de gel

fornechas. As células foram coradas por 15 minutos. O corante Hoechst 33342 foi utilizado para visualizar o ácido nucleico. Os poços foram então lavados com AB e observados usando o microscópio de fluorescência EVOS enquanto ainda viável. Para microscopia confocal, foi utilizado o microscópio Leica SP8 no Stanford Cell Sciences Imaging Facility. Os poços foram então lavados com AB e observados usando o microscópio Leica sp8. O corante Hoechst 33342 foi usado para visualizar núcleos. Para estudos de toxicidade, o PrS foi adicionado às células-tronco dos trofoblastos (TSCs) e a viabilidade foi testada com azul de tripano usando um Nexcelom Cellometer.

[0280] Para testar as proteínas marcadas para a capacidade de detectar tumores, 5×10^4 células 4T1-luc foram implantadas em grupos de 5 camundongos BALB/c do sexo masculino, na almofada de gordura axilar esquerda. Os camundongos foram fotografados com imagens de bioluminescência in vivo (BLI) todos os dias para monitorar o crescimento do tumor, iniciando 1 semana após o implante. Os camundongos foram então tratados no dia 11 após o implante com 13 mg/kg de peso corporal de doxorrubicina intraperitoneal (IP), e BLI foi realizado no dia seguinte. Camundongos controle portadores de tumores foram deixados sem tratamento com doxorrubicina. 48 horas após o tratamento, os camundongos foram fotografados 1 hora após a injeção intravenosa de traçador (anestesia 1,3 g/kg de IP de uretano), com uma câmera gama A-SPECT de cabeça única (Gamma Medica); Colimador com orifício de 1 mm, 128 etapas em uma matriz de imagem 128×128 , 15 segundos por etapa, ROR de 2,7 cm; FOV = parte superior do peito/pescoço. A dose injetada de cada proteína foi de 160 μ l (800 μ Ci). Os animais foram então sacrificados e a biodistribuição foi realizada. Para o experimento de tratamento com ciclo-hexamida, grupos de 5 camundongos Swiss Webster machos jovens (7 semanas de idade) foram anestesiados (1,3 g/kg de IP de uretano) e injetados por via intravenosa com 50 mg/kg de cicloheximida. 1 hora e 45 minutos após a injeção de cicloheximida, o traçador foi injetado (PrS = 180 μ l/1,2 mCi por dose; anexina V = 170 μ l/1,05 mCi por

dose). 45 minutos após a injeção do marcador, os camundongos foram fotografados com 10 minutos de imagens estáticas de corpo inteiro usando um colimador de orifício paralelo de cabeça única (matriz 128 x 128) na câmera gama A-SPECT.

[0281] Para teste para a localização específica do PrS fluorescente aos locais apoptóticos devido à infecção em animais vivos, camundongos CD1 foram injetados por via intravenosa com *Listeria monocytogenes* bioluminescente. Este patógeno bacteriano infecta muitos órgãos, incluindo o baço, nos quais ocorre extensa apoptose de monócitos e granulócitos. Em certos momentos após a infecção, o baço é o principal local de replicação bacteriana e, portanto, os sinais BLI esplênicos das bactérias podem ser correlacionados com a localização de sondas para apoptose. Os camundongos foram infectados e fotografados a cada dia. Quando os sinais de esplênicos foram evidentes (dia 2 pós infecção para 2×10^5 unidades formadoras de colônias de bactérias formadoras em camundongos fêmea CD1 com 8 semanas de idade), 300 mg/kg de massa corporal de Cy5 PrS foram injetadas em camundongos, os animais foram sacrificados 30 minutos mais tarde, e os baços foram removidos, congelados em OCT e seccionados para microscopia de fluorescência. Camundongos controle não infectados foram utilizados.

[0282] A citometria de fluxo foi realizada. Utilizou-se FITC PrS recentemente marcado, preparado como descrito acima. As células-tronco hematopoiéticas murinas (HSCs) são rotineiramente purificadas neste laboratório. As células foram isoladas da medula óssea de camundongo normal por coloração para c-Kit+, células negativas para linhagem. Para caracterizar ainda mais as células, também foi realizada a coloração do marcador SLAM. Esses marcadores marcam as células que se renovam e se diferenciam, enquanto os HSCs que não são de coloração só podem se diferenciar. A coloração subsequente com FITC PrS divulgou a porcentagem positiva nas células de coloração SLAM, como mostrado nos Resultados. As células foram

então classificadas para FITC e examinadas com microscopia confocal, usando Hoechst 33342 para visualização nuclear.

RESULTADOS

[0283] Para avaliar PrS especificidade de ligação no contexto de apoptose em cultura de células, foram utilizadas várias linhas celulares de câncer de mama murinas e humanas. A apoptose foi induzida com peróxido como descrito acima, e a ligação ao FITC PrS foi avaliada. Exemplos dessas experiências são mostrados na **Figura 2**. As células não tratadas exibiram ligação mínima, como mostrado no painel B da **Figura 2**. As concentrações de peróxido e os tempos de incubação foram escolhidos de modo que apenas uma minoria de células seria afetada, porque em concentrações mais altas e/ou em períodos de incubação mais longos, as células destacadas, coloração e microscopia não eram possíveis. Além disso, a presença de muitas células não afetadas serviu como controle negativo interno em cada campo. A FITC - anexina mostrou especificidade para apoptose semelhante à PrS, servindo como controle positivo interno. Em seguida, foram testadas as duas proteínas quanto à colocalização e ligação competitiva. Para colocalização, foram preparados ambos FITC e PrS marcado com Cy5 e anexina. As células 4T1 foram tratadas com peróxido e coradas com Cy5 e PrS marcado com FITC e anexina, usando ambas as combinações de fluoróforos. As células foram então visualizadas no microscópio de fluorescência EVOS. Os resultados são mostrados na **Figura 3**. Sob as condições testadas, todas as células com coloração brilhante exibiram coloração com ambas as proteínas. No entanto, seja usando Cy5 ou FITC, o PrS pareceu corar algumas células que a anexina não corou, embora fracamente (**Figura 3**). A intensidade relativa da coloração de diferentes células por cada proteína diferia algumas vezes entre as duas sondas, isto é, às vezes a anexina corava duas células com intensidade igual e o PrS não, e vice-versa (**Figura 3A**, seta verde e inserção). Assim, enquanto as duas sondas geralmente coravam as mesmas células, elas pareciam exibir diferenças sutis. No ensaio de competição, quantidades excessivas crescentes

de anexina não marcada foram pré-incubadas com células apoptóticas 4T1 por 15 minutos e as células foram então coradas com Cy5 PrS. Surpreendentemente, a coloração de PrS não foi bloqueada nem pelo excesso de 1.000 vezes de anexina, a maior quantidade excedente testada (**Figura 3C**), embora se pense que essas proteínas se ligam à mesma molécula alvo, a PS exposta. Co-coloração de anexina e PrS foi observada com muitos tipos de células. Enquanto as duas proteínas geralmente coraram as mesmas células em cada tipo de célula, outras diferenças se tornaram aparentes. Em particular, alguns objetos menores que as células foram diferencialmente corados (**Figura 4**). Esses objetos, que estavam presentes em maior número após o tratamento com peróxido, foram interpretados como corpos apoptóticos; fragmentos celulares ligados à membrana produzidos durante a fragmentação das células apoptóticas. Como mostrado na **Figura 4**, o PrS corou essas entidades, enquanto a anexina não, embora alguns desses objetos tenham corado com as duas proteínas. Essa observação foi inesperada. Para explorar ainda mais a coloração diferencial de entidades subcelulares, vesículas extracelulares (EVs) foram preparadas a partir de células tumorais murinas 4T1 usando um protocolo padrão de centrifugação. As duas proteínas também coraram diferencialmente essas vesículas (**Figura 5**), um resultado que pode ter implicações biológicas e terapêuticas.

[0284] Presume-se que EVs, especificamente exossomas, microvesículas (MVS) e corpos apoptóticos (ABS) desempenham um papel-chave na comunicação célula-célula através de transferência de biomoléculas entre as células. A biogênese desses tipos de EVs difere, e elas se originam das membranas endossômicas (exossomos) ou plasmáticas (MV) ou são produtos da morte celular programada (ABs). Pensa-se que todas as células de mamíferos secretam EVs. Cada tipo de EV pode transferir carga molecular para células vizinhas e distantes, afetando comportamentos celulares como os envolvidos no desenvolvimento e progressão do tumor. De fato, as EVs podem desempenhar um papel em quase todas as características do câncer,

incluindo sustentar a sinalização proliferativa, evitar a supressão do crescimento, resistir à morte celular, reprogramar o metabolismo energético, adquirir instabilidade genômica e desenvolver o microambiente tumoral. Elas também foram implicadas na indução da angiogênese, controle da invasão, iniciação de nichos pré-metastáticos, sustentação da inflamação e fuga da vigilância imunológica. As células imunes parecem também se comunicar através das EVs e as reconhecer como sinais de células tumorais, tecidos infectados e feridas. Uma compreensão mais profunda da biologia das EVs e sua contribuição para as características do câncer está levando a novas possibilidades de diagnóstico e tratamento do câncer. O desenvolvimento de marcadores de superfície EV adicionais é essencial para avançar neste campo e o PrS pode ser um determinante.

[0285] Dando sequência a esses estudos com microscopia de fluorescência, a localização subcelular da coloração por PrS e anexina foi então avaliada por meio de microscopia confocal. Células de murino 4T1 (faltando os repórteres Luc-GFP) foram plaqueadas em lâminas com câmara de 8 partes a 1×10^4 células por câmara e a apoptose foi induzida com 2mM de H_2O_2 ou o t-BHP (2 horas de exposição) no dia seguinte. As células foram então lavadas e coradas por 15 minutos com PrS e anexina. O corante Hoechst 33342 foi utilizado para colorir o ácido nucleico. Em todos os casos, as células com coloração mais brilhante foram coradas com ambas as sondas. No entanto, em muitas células a PrS marcada foi observada no citoplasma, enquanto a anexina marcada não foi (**Figura 6**). Embora a anexina tenha sido internalizada e apareça nas vesículas de algumas células, a anexina internalizada juntamente com o PrS localizado na superfície na mesma célula não foi observada. Esses resultados foram inesperados, pois presume-se que as duas proteínas se ligam ao PS. Para estudar ainda mais a internalização do PrS, foi realizado um experimento no curso do tempo. As células apoptóticas 4T1 foram coradas por 5 minutos com anexina Cy5 e FITC PrS e observadas dentro de 5 minutos após a adição das sondas. O PrS foi observado no citoplasma dessas células imediatamente,

indicando internalização em 5 minutos (**Figura 7**). As imagens no curso do tempo também mostraram que o PrS e a anexina nem sempre coram as mesmas células igualmente nos primeiros momentos. As células da **Figura 7** parecem estar em diferentes estágios de apoptose, pois a célula da esquerda mostra um núcleo não condensado cercado por uma membrana nuclear aparentemente intacta, enquanto a célula direita exibe a forte coloração, muitas vezes característica da condensação da cromatina que ocorre mais tarde no processo apoptótico. Padrões de coloração como esses podem indicar que o PrS se liga mais cedo na apoptose do que a anexina. Embora puramente conjecturas neste momento, essa preferência explicaria muitas das diferenças entre essas proteínas que foram observadas até agora. Por exemplo, a coloração de algumas células por PrS e não por anexina, como nas **Figuras 3A e B**, pode ser devida à ligação anterior de PrS no processo de apoptose. Para examinar a localização do PrS em animais vivos, foram realizadas várias experiências. Esses estudos utilizaram indução química e infecciosa de apoptose in vivo, bem como a localização de PrS em tumores tratados com doxorrubicina, que é conhecida por induzir apoptose. A imagem SPECT usando PrS marcado com HYNIC e anexina foi realizada em animais que receberam tumores de mama 4T1luc e tratados com doxorrubicina. Como os tumores 4T1 foram marcados com luciferase, eles podem ser visualizados em camundongos usando imagens de bioluminescência in vivo (BLI). Uma das imagens desta experiência é mostrada na **Figura 8**. Este método pode ser usado para avaliar a implantação tumoral e acompanhar a progressão em animais individuais ao longo do tempo. PrS marcado com ^{99m}Tc e anexina foram então utilizados para visualização SPECT de animais tratados com doxorrubicina e controles. Um exemplo dos resultados é mostrado na **Figura 9**. As imagens da cabeça e do tórax dos dois animais mostram acúmulo inespecífico da sonda PrS na glândula salivar e baixa relação sinal-ruído usando essa sonda. Portanto, o limiar da exibição nas imagens PrS mostradas foi reduzido para divulgar mais fundo, resultando em cores falsas mais brilhantes das imagens. A baixa relação sinal-ruído é

provavelmente devida à rotulagem HYNIC de apenas 1 mg de proteína, o que é sub-ideal, e também devido à incapacidade de realizar estudos controlados da relação de rotulagem HYNIC:proteína.

[0286] A visualização SPECT de camundongos tratados com ciclo-hexamida, que induz a apoptose no fígado, também foi efetuada (**Figura 10**). Na **Figura 10**, as imagens de corpo inteiro de 5 camundongos são mostradas em cada painel. Tal como acontece com muitas sondas radiomarcadas, o fundo é visto nos rins. O tratamento dos camundongos com ciclo-hexamida aumentou o sinal SPECT da anexina no fígado. Novamente, o PrS mostrou sinal baixo comparado com a anexina. A anexina foi capaz de detectar o fígado apoptótico de camundongos tratados com ciclo-hexamida, enquanto o PrS mostrou apenas um ligeiro aumento do sinal no fígado devido ao tratamento. Para testar a localização de PrS em tecidos apoptóticos e tumores tratados independentemente da imagem SPECT e as complicações concomitantes da marcação HYNIC, camundongos infectados com bactérias que induzem respostas apoptóticas e camundongos portadores de tumor foram injetados com Cy5 PrS. Para a infecção, utilizou-se *Listeria monocytogenes*, um patógeno bacteriano marcado com luciferase e bem caracterizado para BLI. Os sinais BLI característicos do baço oferecem excelentes estudos de colocalização. Os camundongos CD1 foram infectados como descrito acima e foram fotografados com BLI no dia 2 após a infecção. Os camundongos foram então injetados com Cy5 PrS e 30 minutos depois sacrificados, e os baços removidos para microscopia de corte e fluorescência (**Figura 11**). Em todos os casos, as seções esplênicas de camundongos infectados mostraram sinais de fluorescência Cy5 muito maiores que os controles. Na **Figura 11**, o camundongo infectado mostrado exibia baixa contagem de fótons, indicando que a infecção ainda não havia progredido muito longe neste animal. Muitos camundongos exibem 10 vezes essa intensidade de sinal do baço neste dia. No entanto, a fluorescência do canal Cy5 ainda era muito forte em relação ao controle não infectado mostrado. Esse resultado pode refletir a resposta imune inata contínua

à infecção, já que os granulócitos e macrófagos têm demonstrado ser a principal fonte de sinal de anexina nesses animais (essas células são programadas para apoptose para limitar a destruição do tecido).

[0287] A localização dos PrS fluorescentes a tumores 4T1 tratados com doxorrubicina foi então testada. Os camundongos implantados com tumores foram tratados com doxorrubicina como descrito acima e Cy5 PrS foi injetado por via intravenosa 30 minutos antes do sacrifício e remoção dos tumores para microscopia de corte e fluorescência. Os resultados são mostrados na **Figura 12**. Áreas de coloração intensa foram observadas nos animais tratados, enquanto um sinal mais modesto foi observado nas seções de tumor não tratadas. Embora alguns tumores não tratados tenham exibido pequenas áreas com sinal mais alto que o fundo, não foram observados sinais de intensidade semelhante aos tumores tratados em nenhuma das seções não tratadas.

[0288] As células-tronco são distintas no fenótipo de células diferenciadas e podem expressar PS não apoptoticamente para evitar a indução de respostas imunitárias. As células-tronco dos trofoblastos (TSCs) diferenciam-se em vários tipos de trofoblastos em cultura. Os TSCs são preparados a partir de raspagens uterinas de camundongo cultivadas na presença de fator de crescimento de fibroblastos, ativina e heparina. Os TSCs se diferenciam espontaneamente em células gigantes quando esses fatores são removidos do meio (**Figura 13**). Os TSCs coraram com PrS, enquanto os trofoblastos diferenciados derivados dessas células em cultura não coraram (**Figura 14**). Também foi determinado que o PrS é internalizado em células-tronco sem indução apoptótica. Este resultado confirma observações feitas em linhas de células tumorais, nas quais a apoptose foi induzida. Sem indução de apoptose, foi observada coloração mínima nas células tumorais. Para testar a internalização em células-tronco, foram utilizadas células-tronco mesenquimais (MSCs) e TSCs. As MSCs foram preparadas a partir da medula óssea de camundongo. A medula óssea foi lavada de camundongos e cultivada por 6 dias

na ausência de fatores de crescimento. Durante essa incubação, as MSC e as células-tronco hematopoiéticas (HSCs) se replicam, enquanto os fibroblastos aderem, mas não se multiplicam além de algumas gerações. Após 6 dias, uma monocamada é visível. Após a passagem por tripsinização, as MSCs aderentes são retidas, enquanto as HSCs, que crescem em suspensão, são perdidas. Os fibroblastos não persistem devido à ausência de fatores de crescimento e também não são retidos. Assim, esse procedimento simples resulta em uma população quase homogênea de MSCs. Para confirmar a identidade dessas células, as culturas foram tratadas separadamente com dexametasona e fosfato de glicerol (para induzir diferenciação em osteoblastos) ou dexametasona e indometacina (para induzir diferenciação em adipócitos). Os resultados são mostrados na **Figura 15**. Em resposta aos tratamentos acima, células diferenciadas mostraram a aparência das respectivas células. Os adipócitos continham grandes vesículas de gordura e os osteoblastos eram escuros com distinto colágeno intracelular e mineralização.

[0289] Para avaliar o padrão de coloração subcelular, indiferenciadas MSCs foram coradas com anexina e PrS, bem como o reagente de coloração nuclear Hoechst, e observadas com o microscópio confocal. Os resultados das observações são mostrados na **Figura 16**. O PrS foi rapidamente internalizado. No caso de MSC, cerca de 1 em 20 células foram coradas com PrS, consistente com dados anteriores, no entanto, a porcentagem exata que corou não foi determinada. A morfologia das MSCs é heterogênea e as células secretam material abundante no meio, alguns dos quais aderem à superfície da lâmina da câmara, resultando em fundo em algumas das imagens. No entanto, os dados mostram claramente o PrS internalizado, dentro de 5 minutos após a adição e a anexina na superfície. Os TSCs também foram corados e fotografados, como foi feito com as MSCs. As observações confirmam a internalização também nessas células, o que também ocorre dentro de 5 minutos após a adição da proteína. Os resultados são mostrados na **Figura 17**. Os TSCs são morfologicamente bastante variáveis e podem ser multinucleados na

ausência de diferenciação, como pode ser visto na figura. Como nas MSCs, essas células primárias liberam material abundante no meio, algumas das quais foram estabelecidas como vesículas extracelulares (dados anteriores). Esse material, novamente, dificulta a visualização. Alguns EVs coram com anexina e não PrS, e esse fenômeno pode ser visto nos TSCs, na **Figura 18**. Nesta imagem de um cluster de TSCs, as vesículas liberadas pelas células são coradas com anexina e não PrS, que é internalizado. Esses padrões levantam questões interessantes sobre a especificidade e os objetivos vinculativos do PrS e da anexina. Ambas as proteínas têm a reputação de se ligar ao PS. No entanto, a ligação diferencial aos EVs, bem como padrões de localização subcelular distintos, sugerem que eles não se ligam exatamente da mesma maneira. Mais estudos serão necessários para estabelecer a base dessa distinção, que pode se provar significativa. Também observamos a coloração com PrS da linha celular progenitora neural C17.2 (**Figura 19**), que é uma linha celular transformada capaz de diferenciar in vitro em astrócitos e outras células neuronais. Aproximadamente 5% dessas células transformadas foram coradas, embora essa porcentagem seja uma estimativa. Notavelmente, a entrada nos TSCs ocorreu mesmo quando as células foram resfriadas a 4 °° C (**Figura 20**). No entanto, deve-se notar que a câmara não pode ser continuamente resfriada uma vez colocada no microscópio. No entanto, a temperatura não poderia ter aumentado muito dentro do período de 5 minutos do procedimento de visualização. Este resultado, embora provocador, deve ser claramente repetido sob condições mais controladas. Se a descoberta fosse substanciada, o mecanismo teria que ser realmente muito interessante.

[0290] Houve sucesso na coloração de células-tronco hematopoiéticas (HSC) com PrS. Utilizando citometria de fluxo, determinou-se que o HSC cora com PrS e observou-se a internalização do PrS nessas células com microscopia confocal. Os HSC foram identificados e isolados usando a classificação de células ativadas por fluorescência (FACS). As células foram identificadas na medula óssea como células negativas para a linhagem, células

SCA/c-kit positivas (**Figura 21**). Estas foram então coradas com FITC-PrS. Duas populações de HSC, a curto e a longo prazo, podem ser identificadas com o padrão de coloração do marcador SLAM. Os marcadores CD48, CD150, CD229 e CD244 da SLAM (Molécula de Ativação de Linfócitos de Sinalização) colorem diferencialmente o HSC com padrões distintos, de modo que a coloração positiva do padrão SLAM é indicativa da capacidade de se autorrenovar e diferenciar, enquanto o HSC negativo para o padrão SLAM só pode diferenciar. O PrS corou um subconjunto de HSC de longo prazo (**Figura 22**) e também de HSC de curto prazo (**Figura 23**). As células mostradas são negativas com iodeto de propídio (PI), o que significa que são todas células vivas. Este resultado confirma experimentos anteriores que demonstram que um subconjunto de células-tronco cora com PrS sem a indução de apoptose.

[0291] Em seguida, procedeu-se para testar a internalização do PrS no HSC. Esse experimento foi complicado por muitos fatores. Talvez o mais difícil tenha sido a sobrevivência na cultura do HSC, que morre em grande número em média durante a noite. Portanto, foi preciso cronometrar o experimento para que a análise por citometria de fluxo e por microscopia confocal ocorressem no mesmo dia. Além disso, as células não são aderentes, tornando a microscopia abaixo do ideal. Para tornar a microscopia mais eficiente, as células foram ressuspensas em uma pequena gota do meio. Finalmente, era preciso garantir que as células coradas com PrS analisadas por microscopia ainda estivessem vivas. Muitos HSC morreram durante os processos de análise e isolamento. Portanto, PI foi adicionado e escaneado, em adição à coloração nuclear de Hoescht, e outro canal foi utilizado. A presença de núcleos PI-brilhantes indicou células mortas. Apesar dessas dificuldades e das complexidades do tempo, foi possível realizar o experimento e confirmar a internalização do PrS no HSC ao vivo (**Figura 24**). As células foram confirmadas como vivas por falta de coloração de PI nuclear. No entanto, algumas células estavam mortas ou morrendo, como mostra a **Figura 25**. Apesar da

complexidade e duração do experimento mostrado, os resultados mostram internalização.

[0292] Finalmente, na **Figura 26**, foram feitos estudos preliminares de toxicidade no TSC, e determinado que a uma concentração de 135 µg/ml, a viabilidade foi reduzida apenas por uma extensão mínima após 30 minutos, de 78% para 74%, em relação ao PBS. Considerando que, nesse nível, 10% do volume de cultura era uma solução contendo PrS, esse resultado confirmou as observações qualitativas de que o PrS é basicamente não-tóxico para as células-tronco, e a menor toxicidade observada poderia muito bem ser devido à contaminação do conteúdo da preparação em si. Concentrações mais baixas de PrS não mostraram efeito na viabilidade. O nível mais alto de proteína testada foi mais de 1000 vezes a concentração usada para a coloração. Embora estudos completos de toxicidade, que não fizeram parte formalmente deste projeto, exijam testes muito mais extensos, neste experimento o PrS exibe muito pouca toxicidade.

SUMÁRIO

[0293] Os resultados acima mostraram que o PrS é rapidamente internalizado em uma matriz de células que expressa o PrS, incluindo células-tronco de vários tipos, o que sugere que o PrS possui características únicas passíveis de manipulação para o objetivo de desenvolver um agente terapêutico. Além disso, a diferença de especificidade entre PrS e anexina, como visto nas **Figuras 3 e 7**, sugere que a ligação em si é diferente entre essas duas proteínas. O mero fato de a anexina ser um tetrâmero e o PrS ser um monômero não pode explicar essas diferenças e esses dados sugerem que algum outro componente na superfície celular pode estar envolvido na ligação do PrS. O mecanismo de ligação, especificidade e internalização do PrS, bem como a capacidade de manipulação modular, oferecem inúmeras possibilidades.

EXEMPLO 2

[0294] As células-tronco são distintas no fenótipo de células diferenciadas e podem expressar PS não apoptoticamente para evitar a indução de respostas imunes. As células-tronco foram coradas com uma molécula de domínio de GLA da presente divulgação compreendendo uma carga útil de um marcador fluorescente, sem a indução de apoptose.

[0295] Células-tronco trofoblásticas, (**Figura 14**) que se diferenciam em vários tipos de trofoblastos na placenta, coradas com Proteína S, enquanto os trofoblastos diferenciados derivados a partir destas células em cultura não coraram. A coloração foi capaz de distinguir entre células-tronco diferenciadas *in vivo* e células diferenciadas *in vitro*.

[0296] Estes dados das moléculas da presente divulgação podem ser utilizados para alvejar células *in vivo* ou em amostras *ex vivo*.

REFERÊNCIAS

[0297] 1. Thompson, W.W., et al., *Estimates of US influenza-associated deaths made using four different methods*. Influenza Other Respir Viruses, 2009. **3**(1): p. 37 a 49.

[0298] 2. Osterholm, M.T., et al., *Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(1): p. 36-44.

[0299] 3. Dixit, R., et al., *Emergence of oseltamivir resistance: control and management of influenza before, during and after the pandemic*. Infect Disord Drug Targets, 2013. **13**(1): p. 34-45.

[0300] 4. Jefferson, T., et al., *Oseltamivir for influenza in adults and children: systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments*. BMJ, 2014. **348**: p. g2545.

[0301] 5. Godfrey, C., et al., *Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies*. EMBO Mol Med, 2017. **9**(5): p. 545-557.

- [0302] 6. Kaczmarek, J.C., P.S. Kowalski, and D.G. Anderson, *Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality*. Genome Med, 2017. **9**(1): p. 60.
- [0303] 7. Ling, H., *Non-coding RNAs: Therapeutic Strategies and Delivery Systems*. Adv Exp Med Biol, 2016. **937**: p. 229-37.
- [0304] 8. Poon, I.K., et al., *Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 166-80.
- [0305] 9. Birge, R.B., et al., *Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer*. Cell Death Differ, 2016. **23**(6): p. 962-78.
- [0306] 10. Amara, A. and J. Mercer, *Viral apoptotic mimicry*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(8): p. 461-9.
- [0307] 11. Moller-Tank, S. and W. Maury, *Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection*. Virology, 2014. **468-470**: p. 565-80.
- [0308] 12. Ludwig, S., et al., *MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants*. FEBS Lett, 2004. **561**(1-3): p. 37-43.
- [0309] 13. Sharma, R., et al., *Detection of phosphatidylserine-positive exosomes for the diagnosis of early-stage malignancies*. Br J Cancer, 2017. **117**(4): p. 545-552.
- [0310] 14. Azuma, K., et al., *Liver-specific gamma-glutamyl carboxylase-deficient mice display bleeding diathesis and short life span*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88643.
- [0311] 15. Hjortoe, G., et al., *Factor VIIa binding and internalization in hepatocytes*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(10): p. 2264-73.

- [0312] 16. Meliopoulos, V.A., et al., *Host gene targets for novel influenza therapies elucidated by high-throughput RNA interference screens*. FASEB J, 2012. **26**(4): p. 1372-86.
- [0313] 17. Pleschka, S., et al., *Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 301-5.
- [0314] 18. Makkoch, J., et al., *Human microRNAs profiling in response to influenza A viruses (subtypes pH1N1, H3N2, and H5N1)*. Exp Biol Med (Maywood), 2016. **241**(4): p. 409-20.
- [0315] 19. Wolf, S., et al., *MicroRNA Regulation of Human Genes Essential for Influenza A (H7N9) Replication*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0155104.
- [0316] 20. Skalickova, S., et al., *Perspective of Use of Antiviral Peptides against Influenza Virus*. Viruses, 2015. **7**(10): p. 5428-42.
- [0317] 21. Matsubara, T., et al., *Sialic acid-mimic peptides as hemagglutinin inhibitors for anti-influenza therapy*. J Med Chem, 2010. **53**(11): p. 4441-9.
- [0318] 22. Matsubara, T., et al., *Sialic acid-mimic peptides as hemagglutinin inhibitors for anti-influenza therapy*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7517.
- [0319] 23. Ozcan, G., et al., *Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **87**: p. 108-19.
- [0320] 24. Mack, S., et al., *Pseudo-Ligandless Click Chemistry for Oligonucleotide Conjugation*. Curr Protoc Chem Biol, 2016. **8**(2): p. 83-95.
- [0321] 25. Paredes, E. and S.R. Das, *Click chemistry for rapid labeling and ligation of RNA*. Chembiochem, 2011. **12**(1): p. 125-31.

[0322] 26. Zheng, Y. and P.A. Beal, *Synthesis and evaluation of an alkyne-modified ATP analog for enzymatic incorporation into RNA*. Bioorg Med Chem Lett, 2016. **26**(7): p. 1799-802.

[0323] 27. Jain, N., et al., *Current ADC Linker Chemistry*. Pharm Res, 2015. **32** (11): p. 3526-40.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para alvejar uma célula-tronco caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de colocar as células em contato com uma molécula compreendendo uma carga útil ligada a um componente de ácido gama-carboxiglutâmico (componente de GLA)

em que o referido componente de GLA compreende um domínio de GLA ou um fragmento ativo do mesmo, e a referida molécula não compreende um domínio catalítico ativo a partir de uma proteína GLA.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o domínio de GLA ou seu fragmento ativo é selecionado independentemente a partir de trombina, fator VII, fator IX, fator X, proteína C, proteína S, proteína Z, osteocalcina, proteína GLA de matriz (MGP), GAS6, transtiretina (TTR), inibidor da inter-alfa-tripsina, periostina, gla 1 rica em prolina (PRRG1), gla 2 rica em prolina (PRRG2), gla 3 rica em prolina (PRRG3) e gla 4 rica em prolina (PRRG4).

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de GLA ou seu fragmento ativo é proveniente da proteína S.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o componente de GLA compreende ainda um domínio de EGF, por exemplo, um domínio de EGF de ligação ao cálcio.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a construção compreende um domínio de EGF selecionado a partir de trombina, fator VII, fator IX, fator X, proteína C, proteína S, proteína Z, Osteocalcina, proteína GLA de matriz, GAS6, Transtretina, Periostina, GLA 1 rica em prolina, GLA 2 rica em prolina, GLA 3 rica em prolina e GLA 4 rica em prolina.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o domínio de EGF é proveniente da proteína S.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o componente do domínio de GLA compreende ainda um domínio Kringle.

8. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o domínio Kringle é proveniente de uma proteína selecionada do grupo que compreende o Fator de transcrição de ativação 2 (ATF); Fator XII (F12); trombina (F2); Proteína de ligação a hialuronano 2 (HABP2); Fator de crescimento de hepatócitos (HGF); Ativador do fator de crescimento de hepatócitos (HGFAC); Proteína 1 de Kremen (KREMEN1); KREMEN2; Lipoproteína(a) (LPA); LPAL2; Proteína estimuladora de macrófagos (MSP ou MST1); Proteína 1 que interage com fosfoinositida-3-cinase (PIK3IP1); Ativador de plasminogênio tecidual (PLAT); Uroquinase(PLAU); Plasmina (PLG); PRSS12; Tirosina-cinase de proteína do receptor da transmembrana ROR1 (ROR1); e tirosina-cinase de proteína do receptor da transmembrana ROR2 (ROR2).

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o componente de GLA compreende uma sequência mostrada na SEQ ID NO: 6.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o método é realizado *in vitro*.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a entrega é para uma célula *in vivo*, por exemplo, em que a molécula compreendendo o componente de GLA e a carga útil são administradas a um paciente.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a molécula tem como alvo o exterior da célula-tronco.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a molécula é internalizada na célula-tronco.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a célula é não apoptótica.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a célula é apoptótica, por exemplo, uma célula-tronco doente.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco é uma célula-tronco embrionária ou células-tronco adultas, incluindo células progenitoras e células-tronco hematopoiéticas, células-tronco miogênicas, células-tronco osteoprogenitoras, células-tronco neurais, células-tronco mesenquimais, como células satélites, células gliais radiais, células estromais da medula óssea, periósteo, células progenitoras pancreáticas, células progenitoras endoteliais, células blásticas e células-tronco trofoblásticas.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco expressa um marcador de superfície CD34.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco é negativa para marcadores de superfície positivos para a linhagem (isto é, é Lin-ve).

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco é CD90+ve, CD133+ve, CD105+ve, CD45+, Lin-ve, CD48-ve e CD244-ve.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco é Lin-ve, CD34+ve, CD38-ve, CD45RA-ve, CD90+ve e CD49f _+ve.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco não é cancerígena.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco é uma célula-tronco de câncer.

23. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco cancerígena é de origem epitelial.

24. Método, de acordo com a reivindicação 44 ou 45, caracterizado pelo fato de que as células-tronco cancerígenas expressam um marcador de superfície selecionado a partir de CD44 (que é super expresso em pelo menos câncer de mama, ovário, próstata, câncer de pâncreas, escamoso e bexiga), CD133 (que é super expresso em pelo menos cérebro, cólon, pulmão, câncer de próstata e meduloblastoma), CD24, CD90, CD271, CD4f, CD13 e combinações de dois ou mais do mesmo.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco é de origem hematopoiética.

Figura 1A

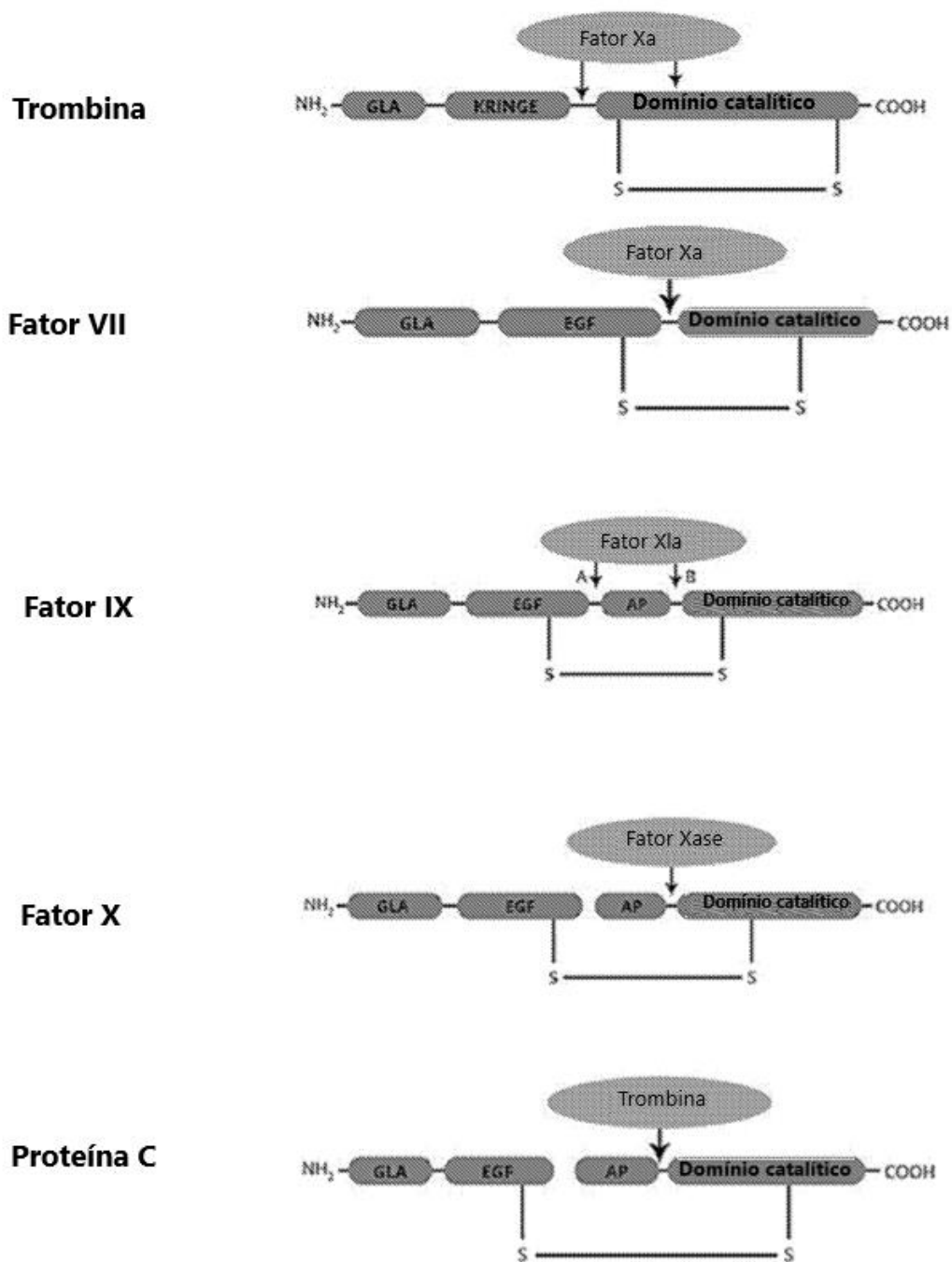


Figura 2

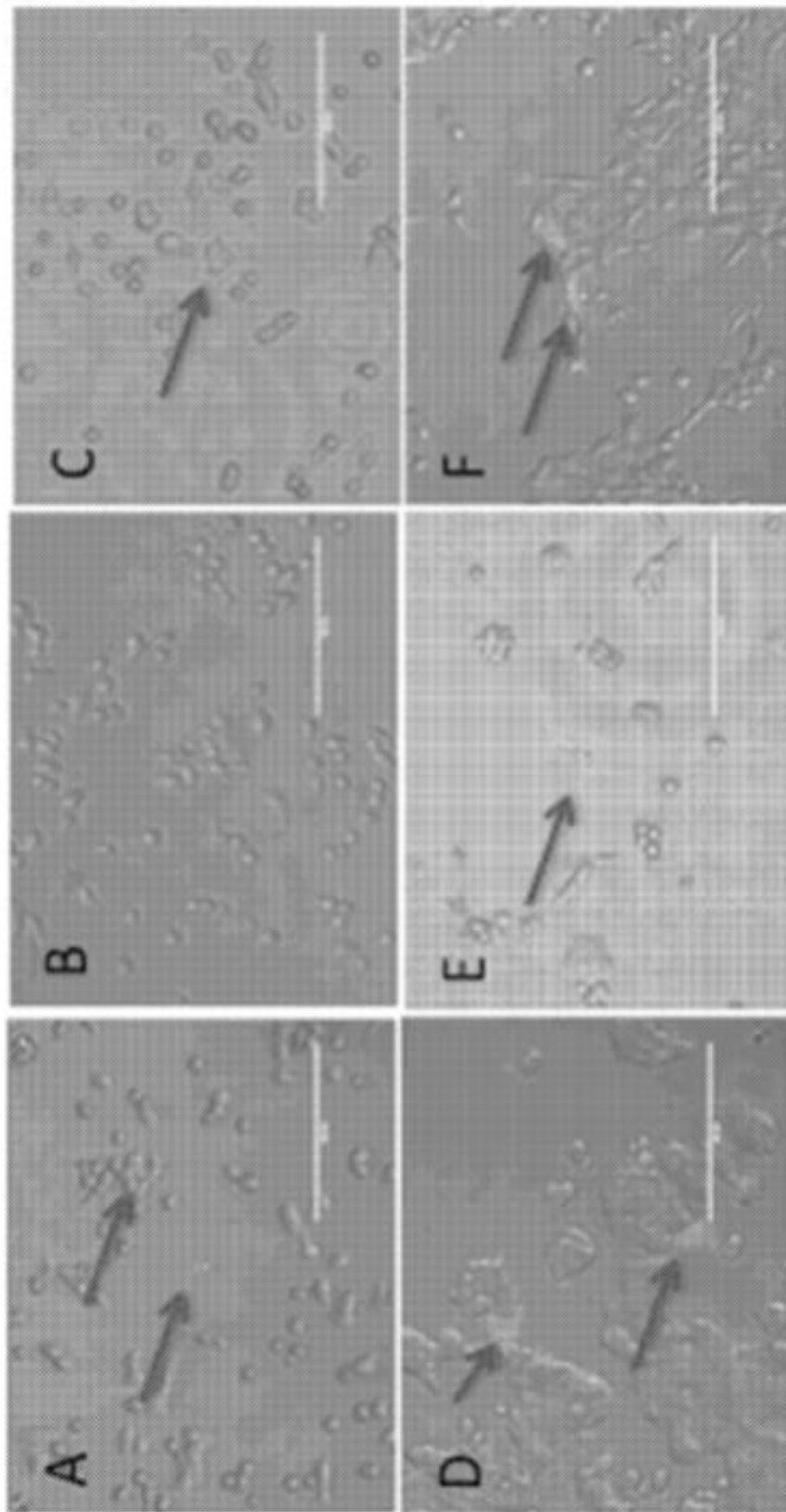
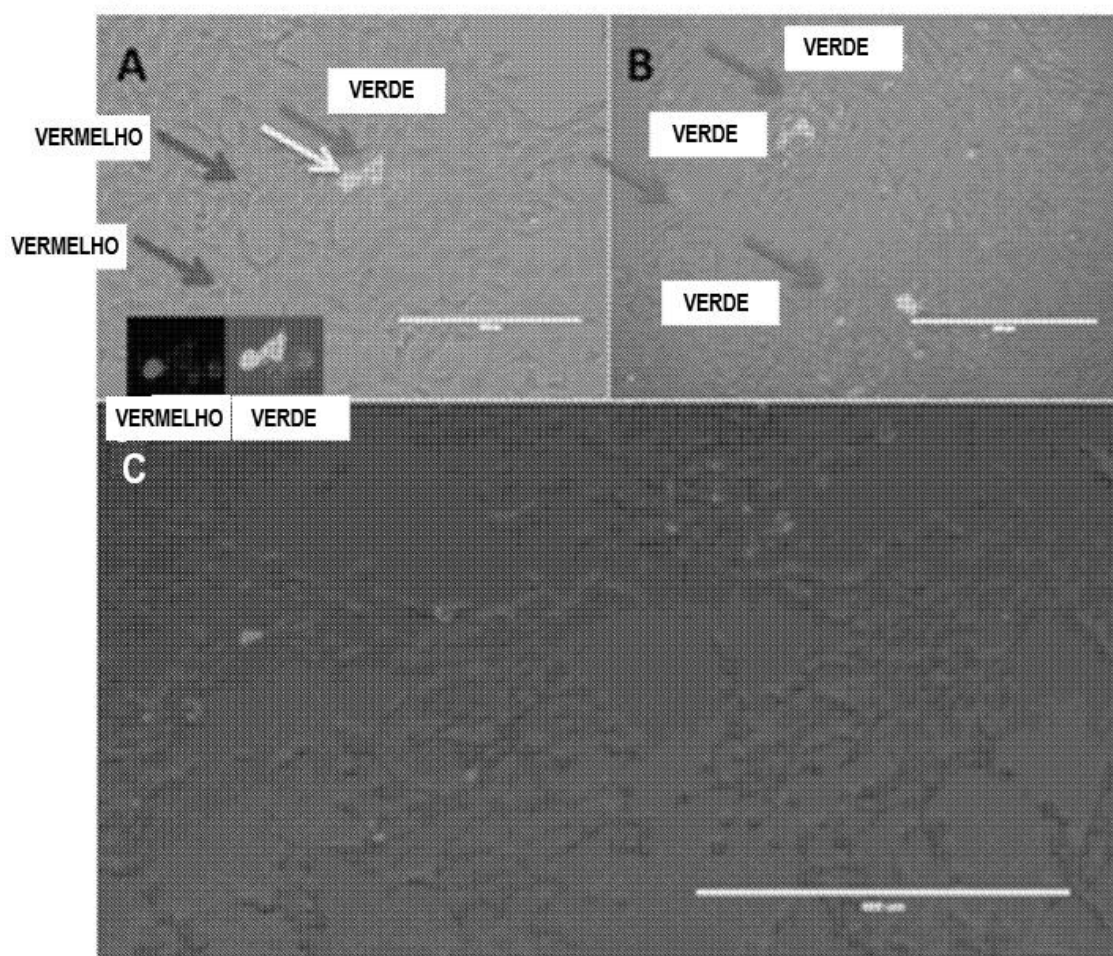


Figura 3



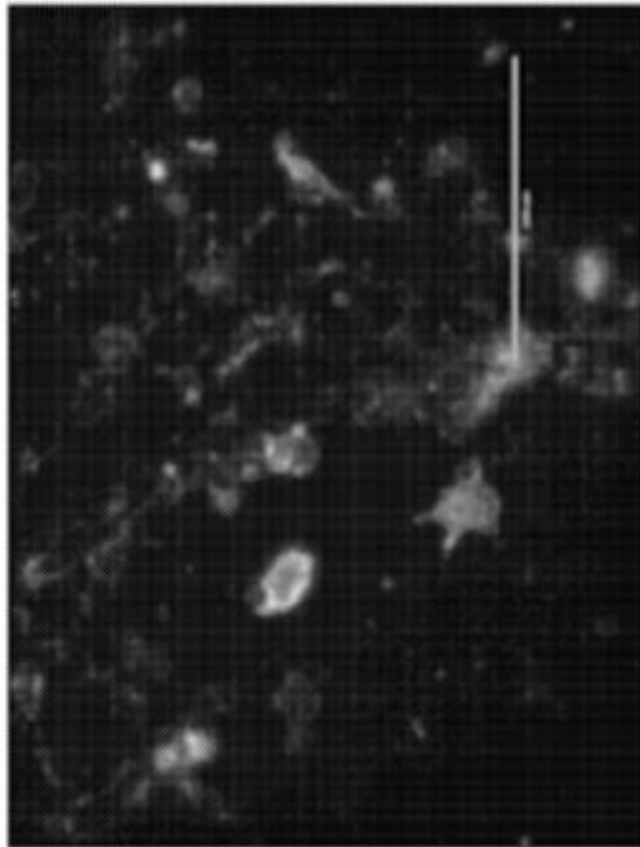
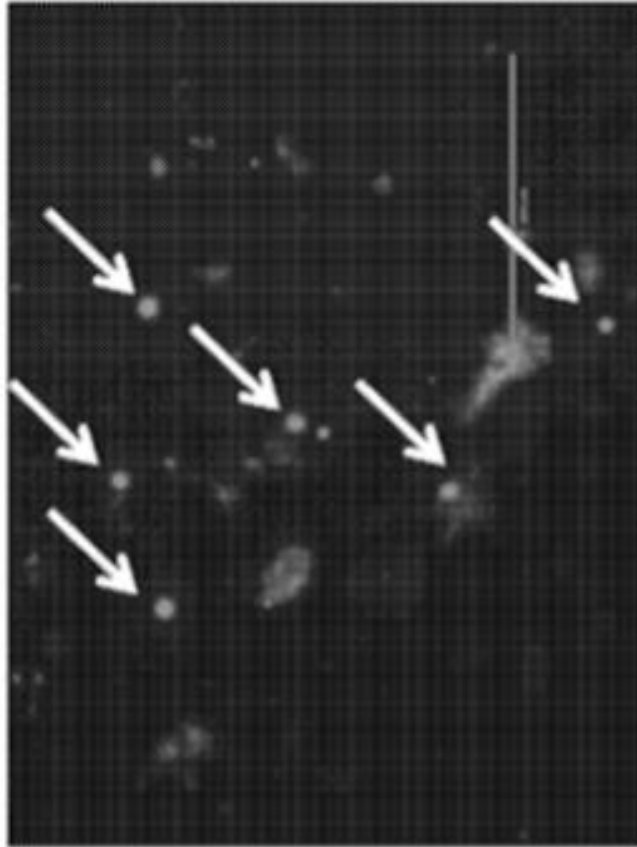


Figura 4

Figura 5

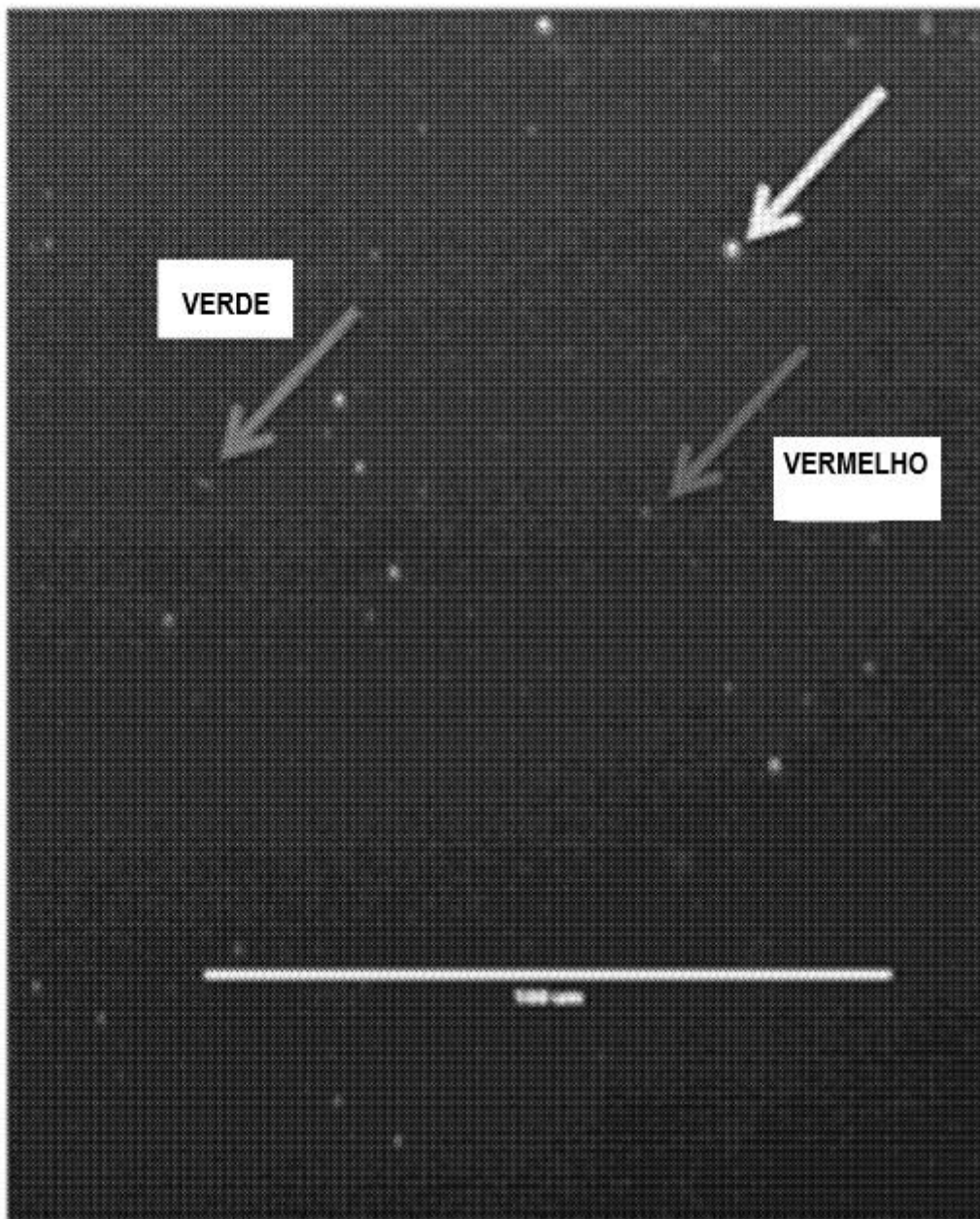


Figura 6

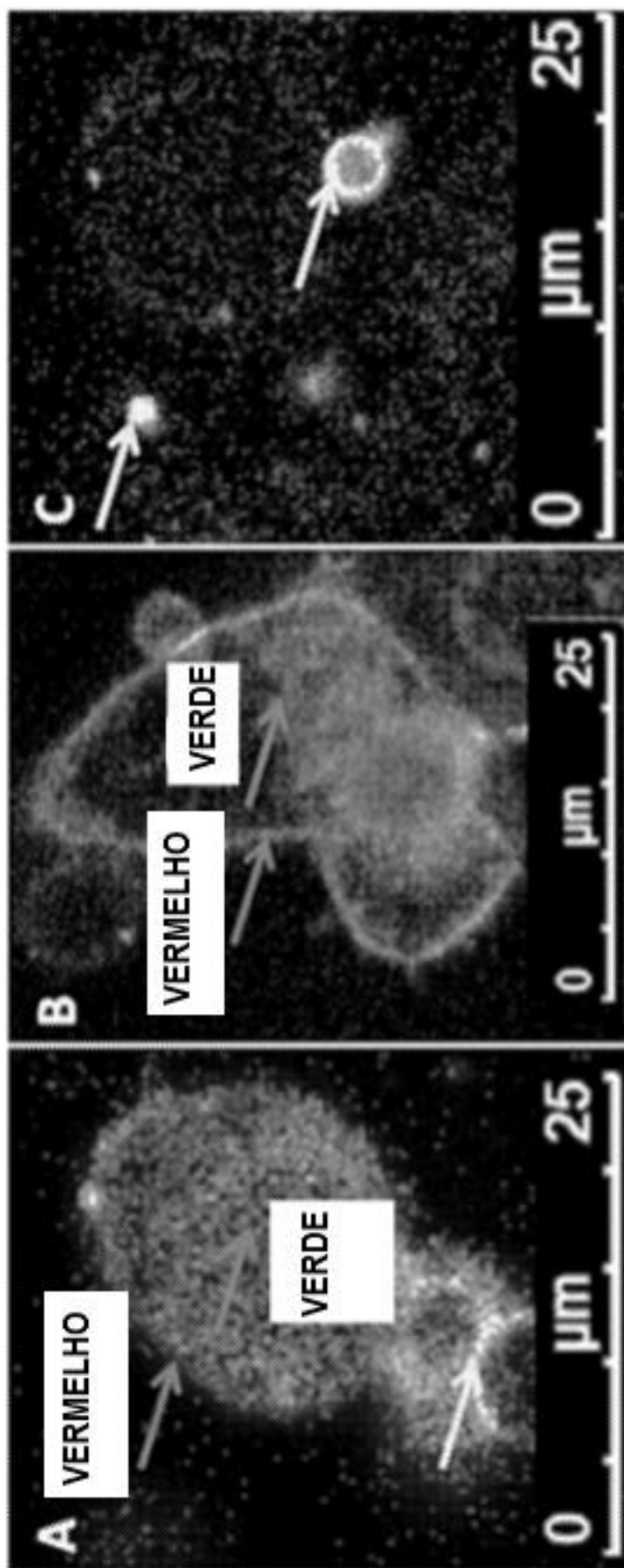
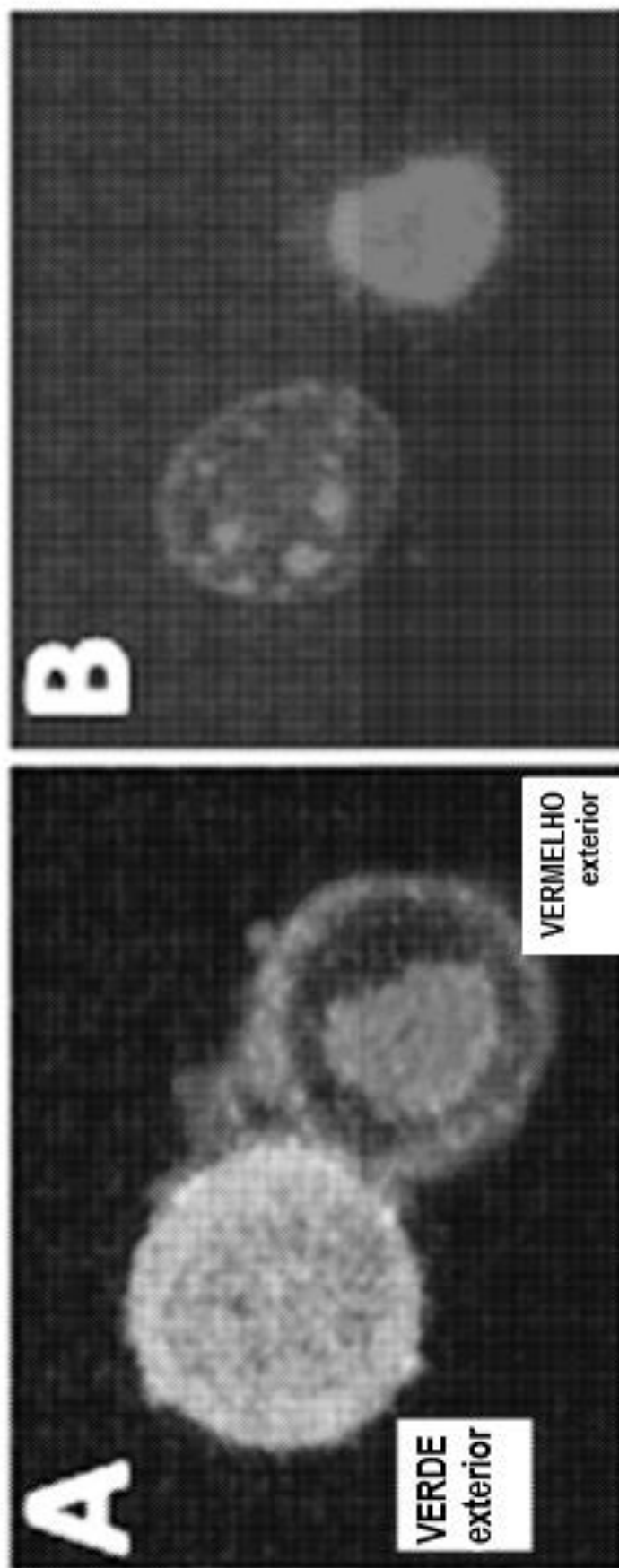


Figura 7

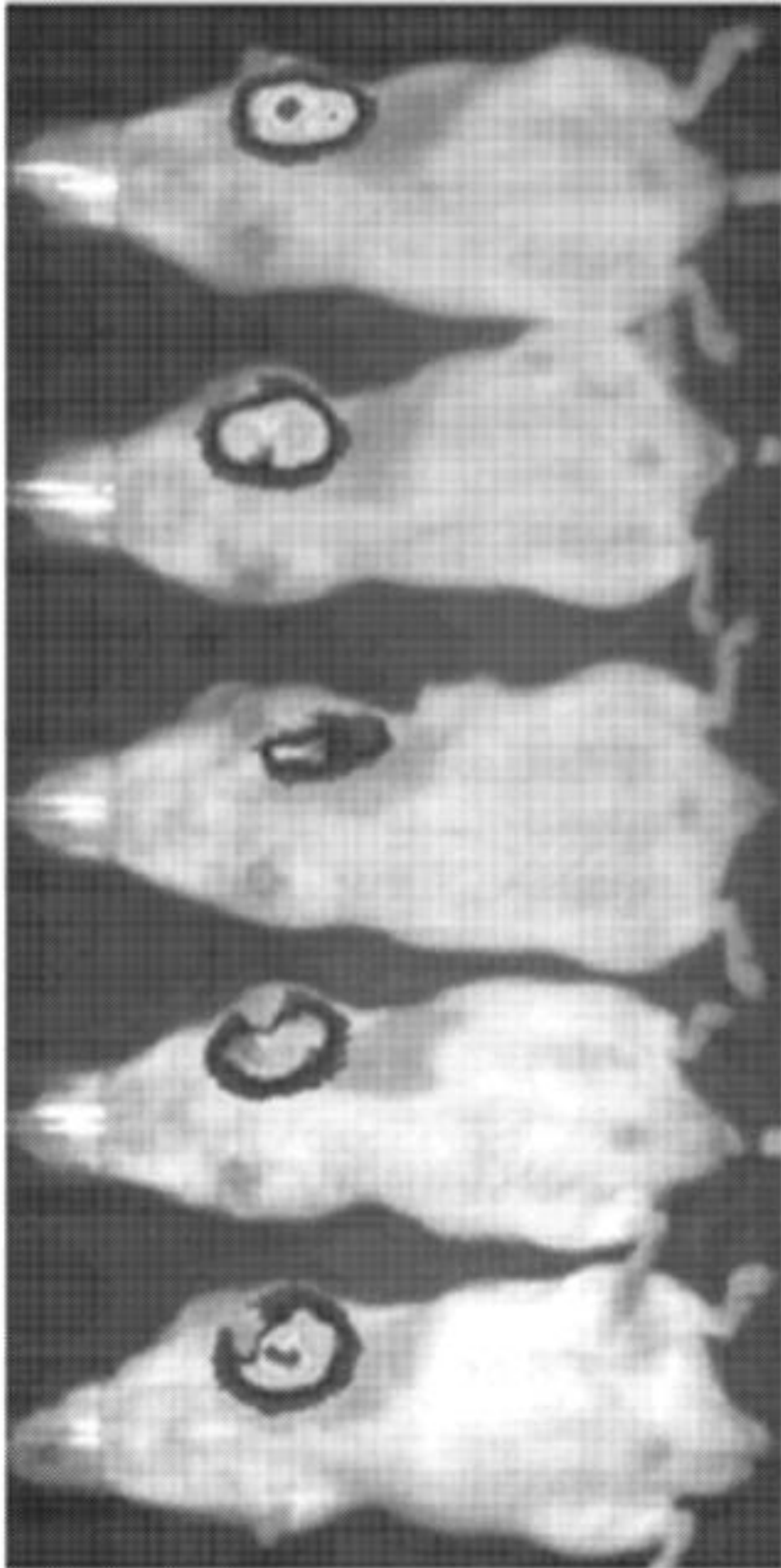


Figura 8

Figura 9

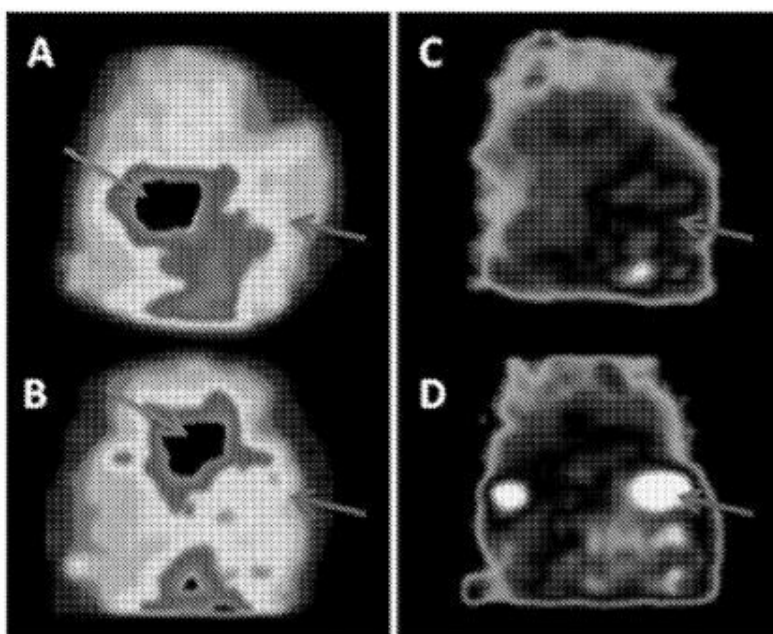


Figura 10

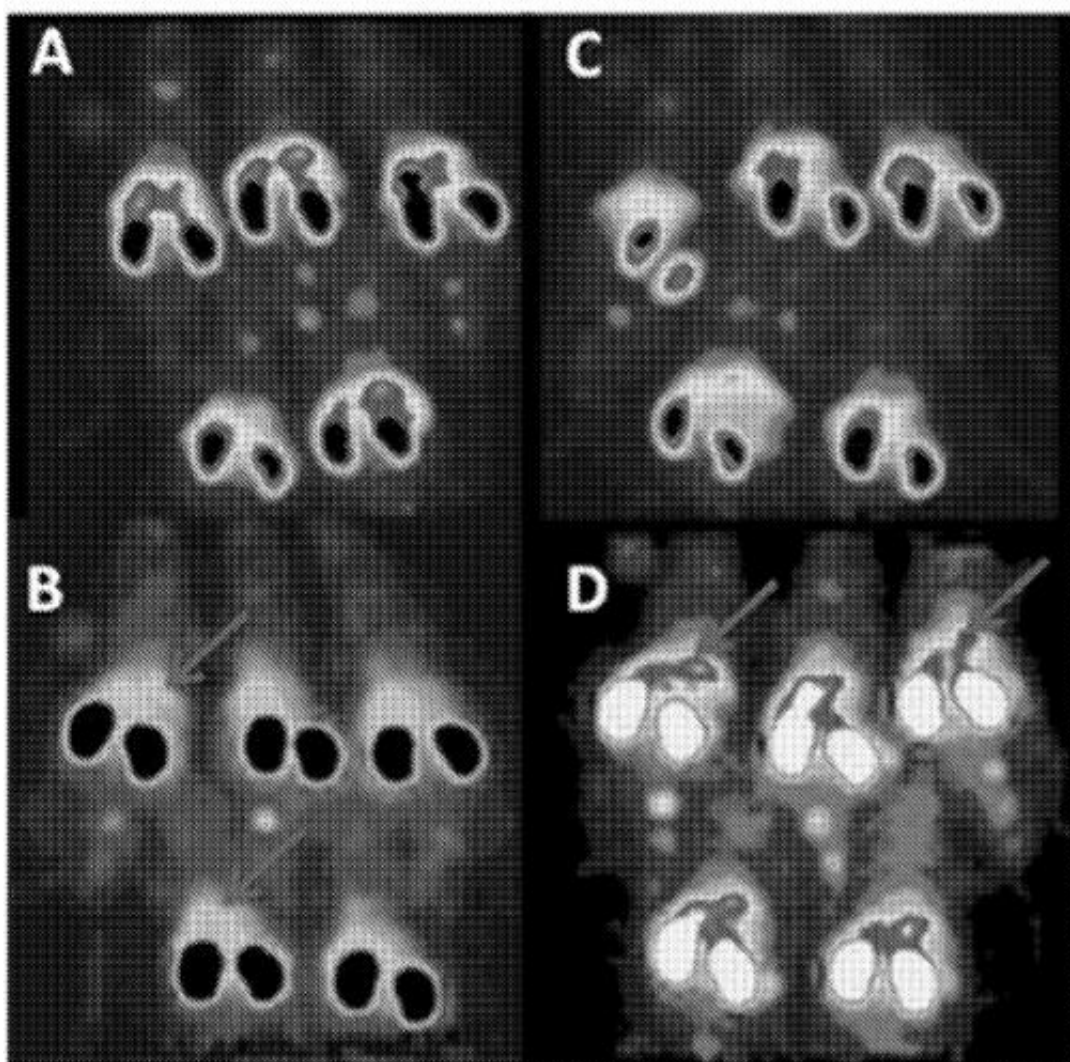
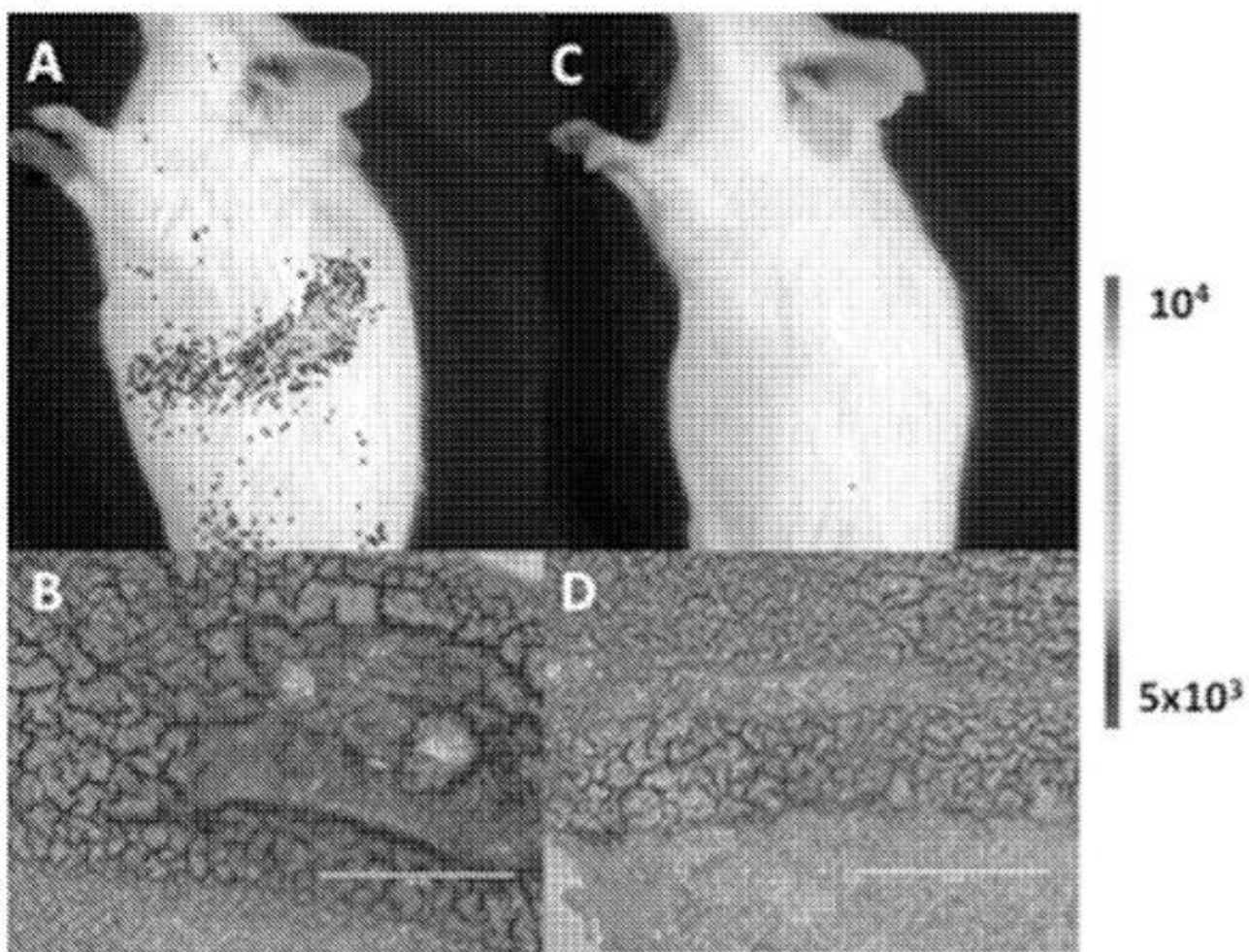


Figura 11



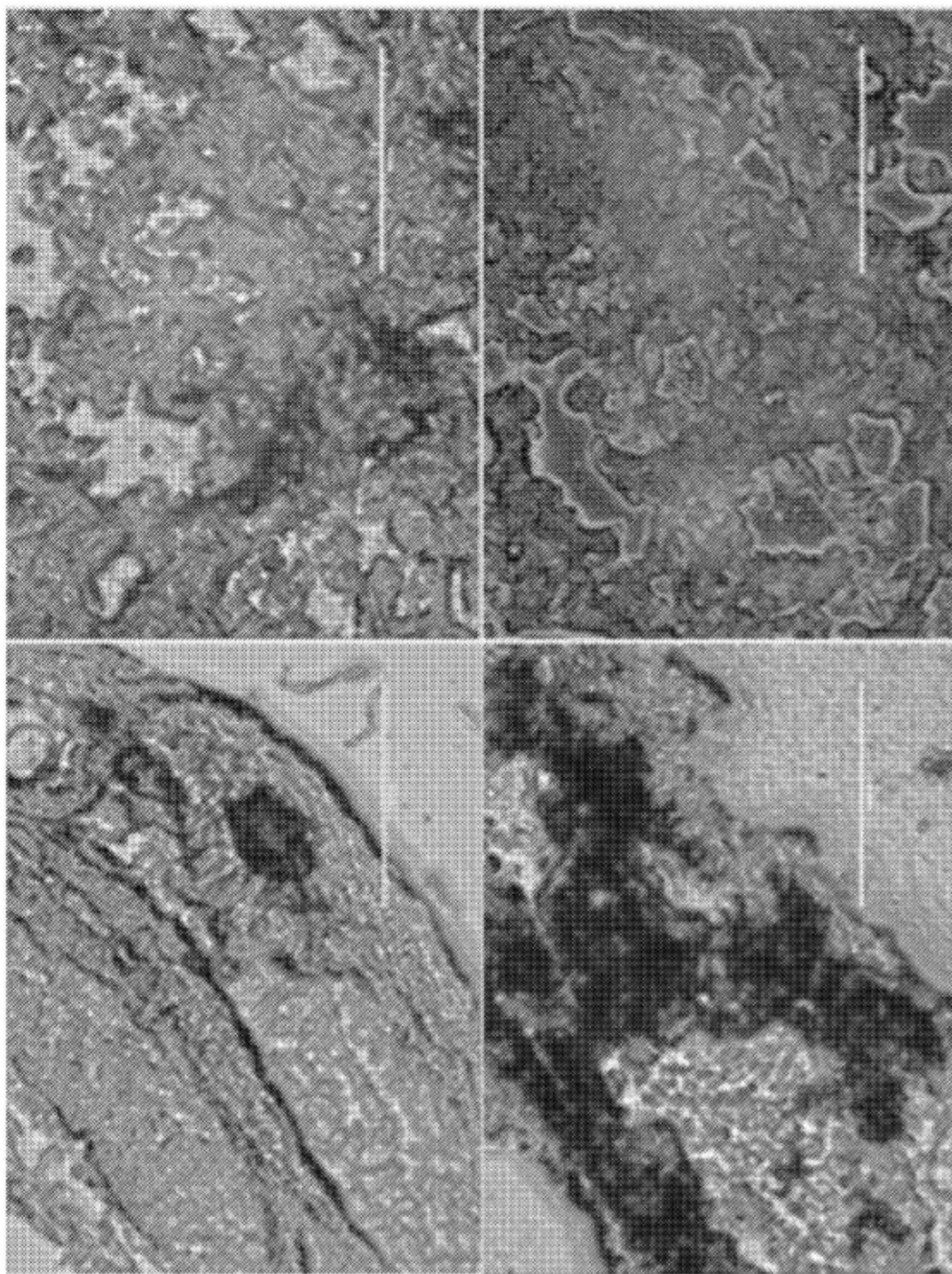


Figura 12

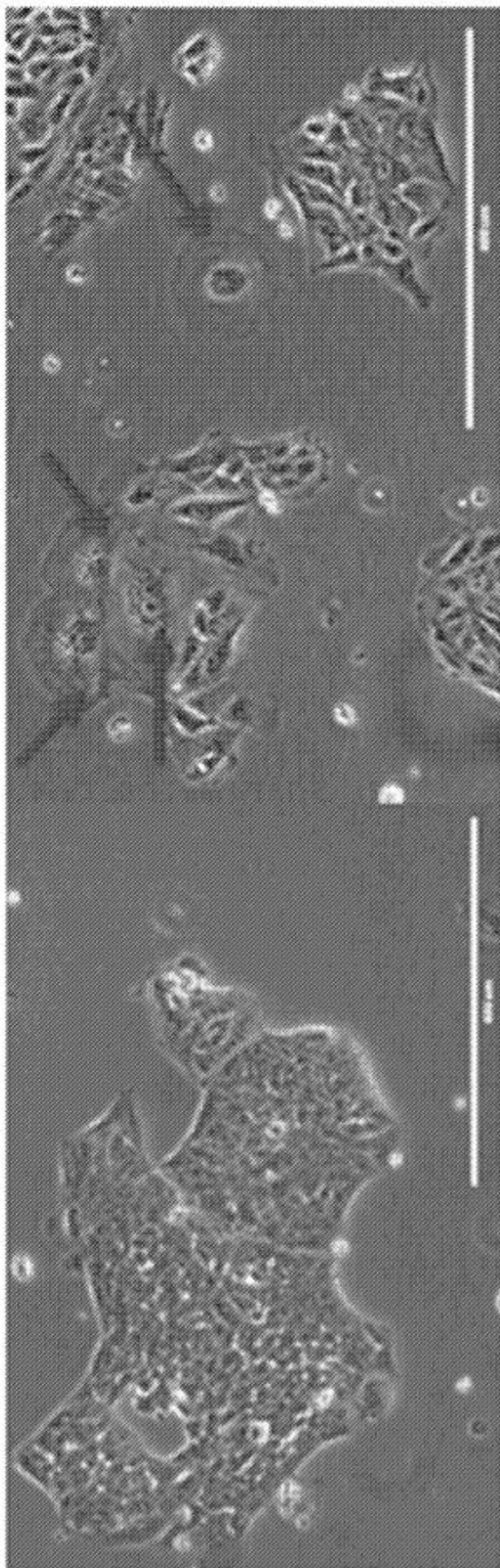
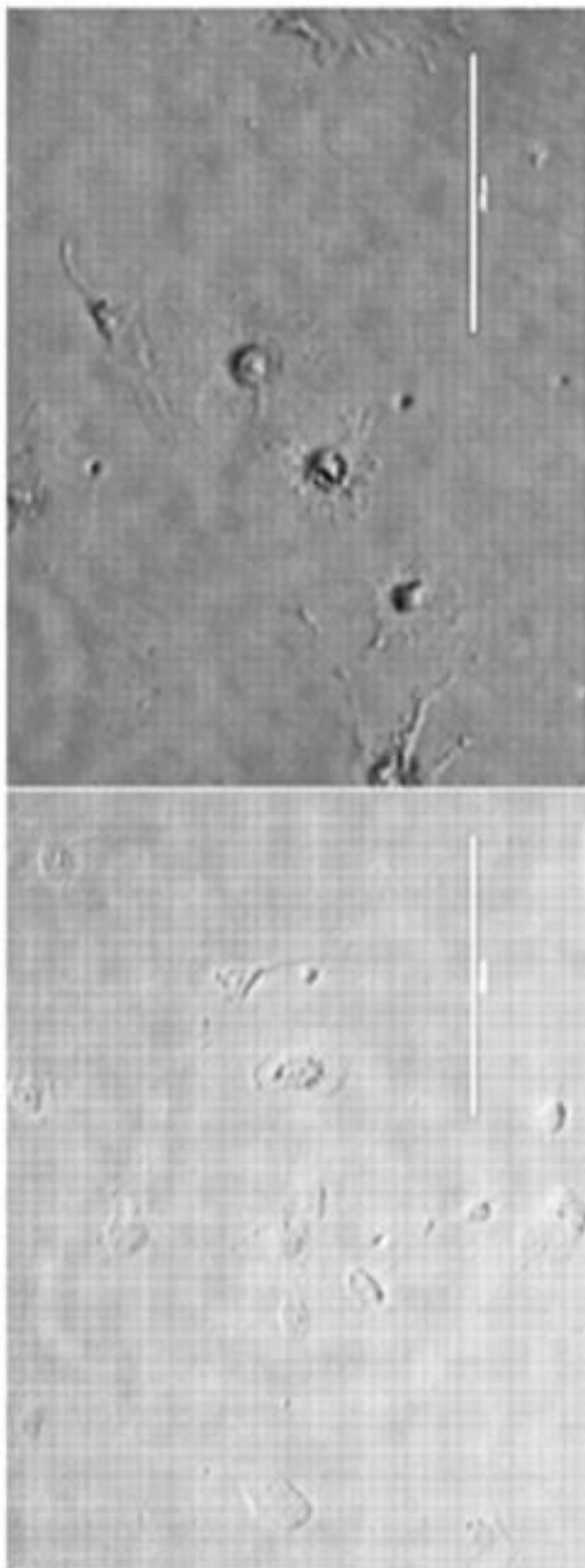
Figura 13

Figura 14



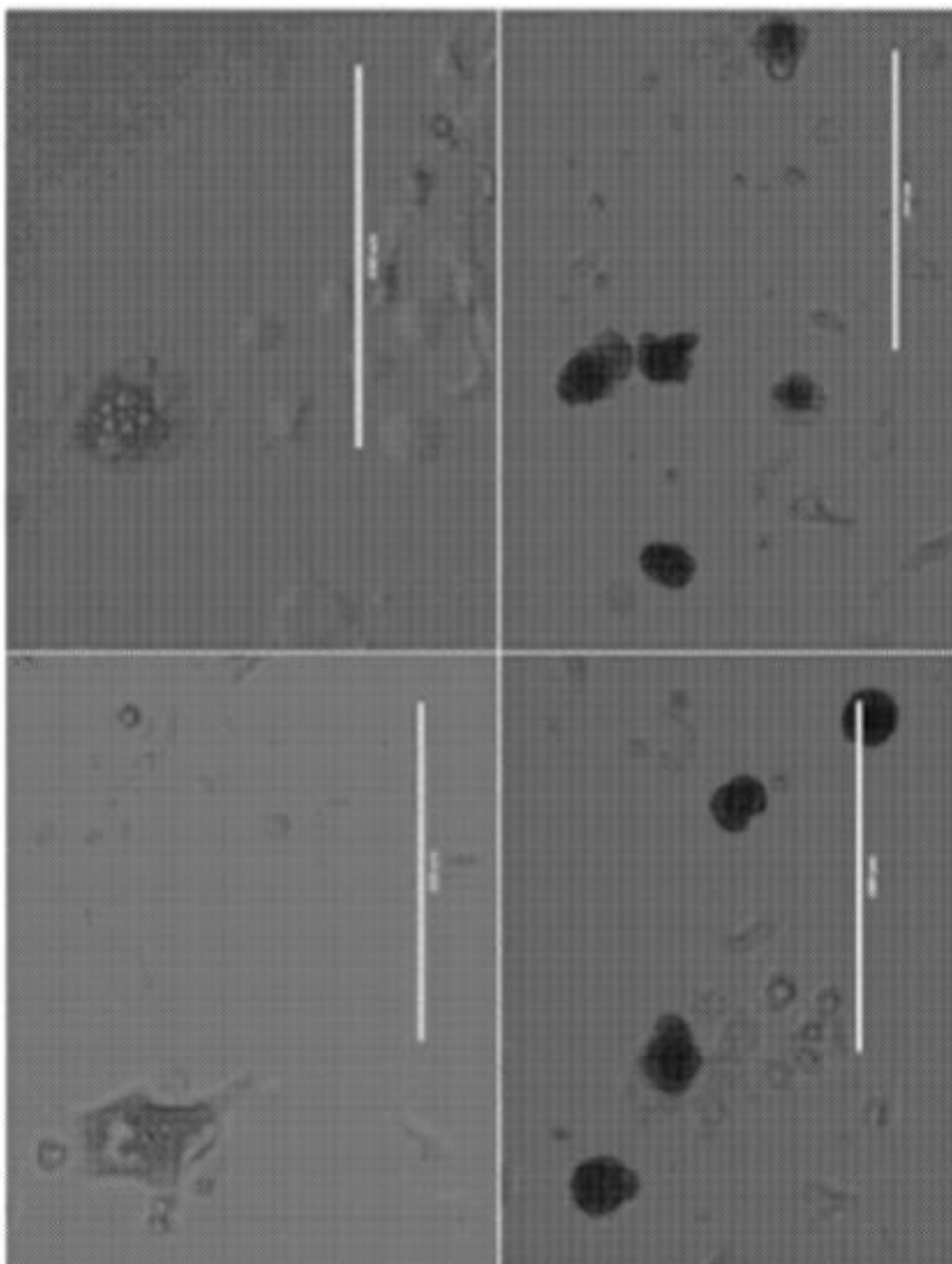


Figura 15

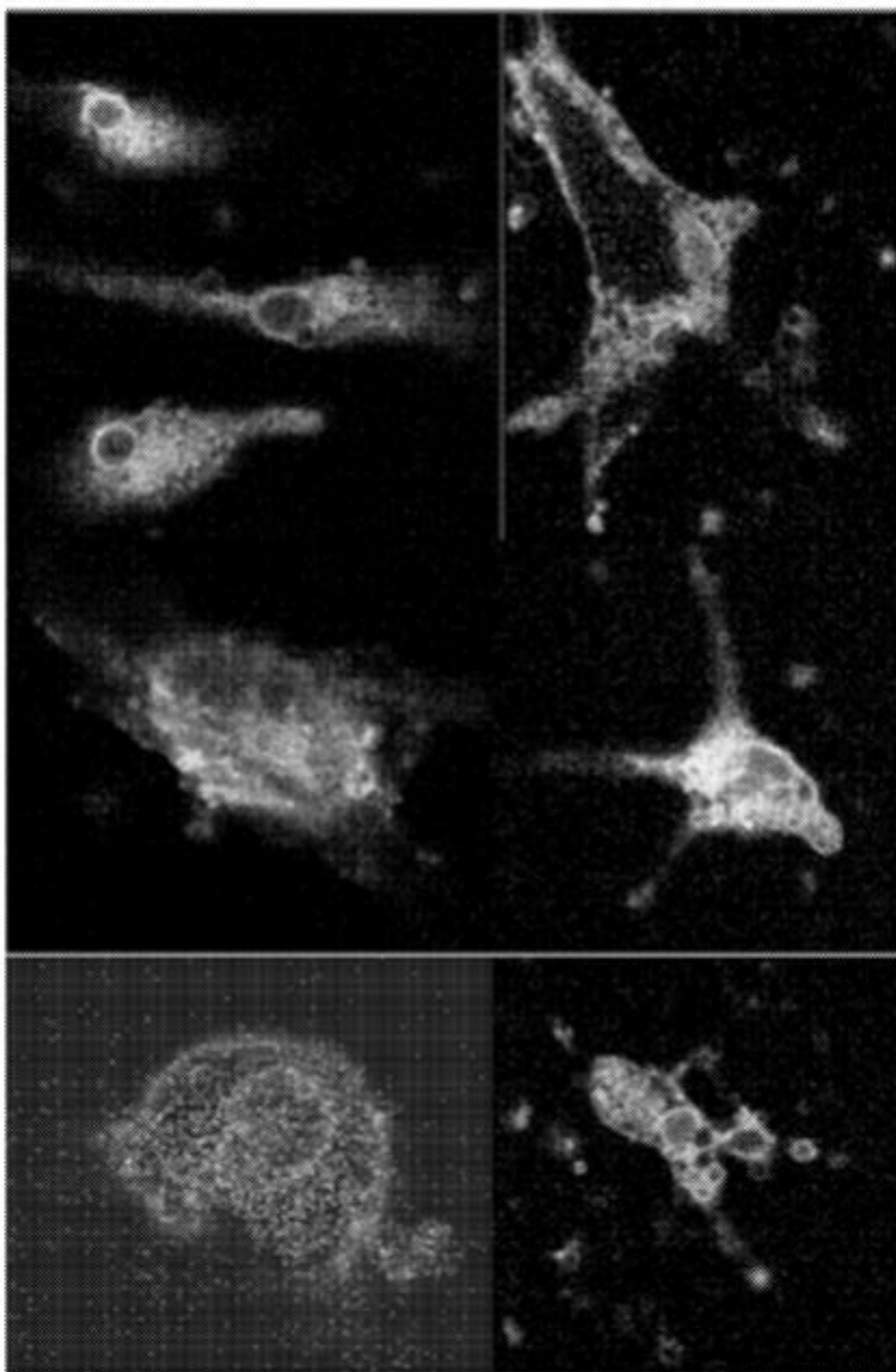
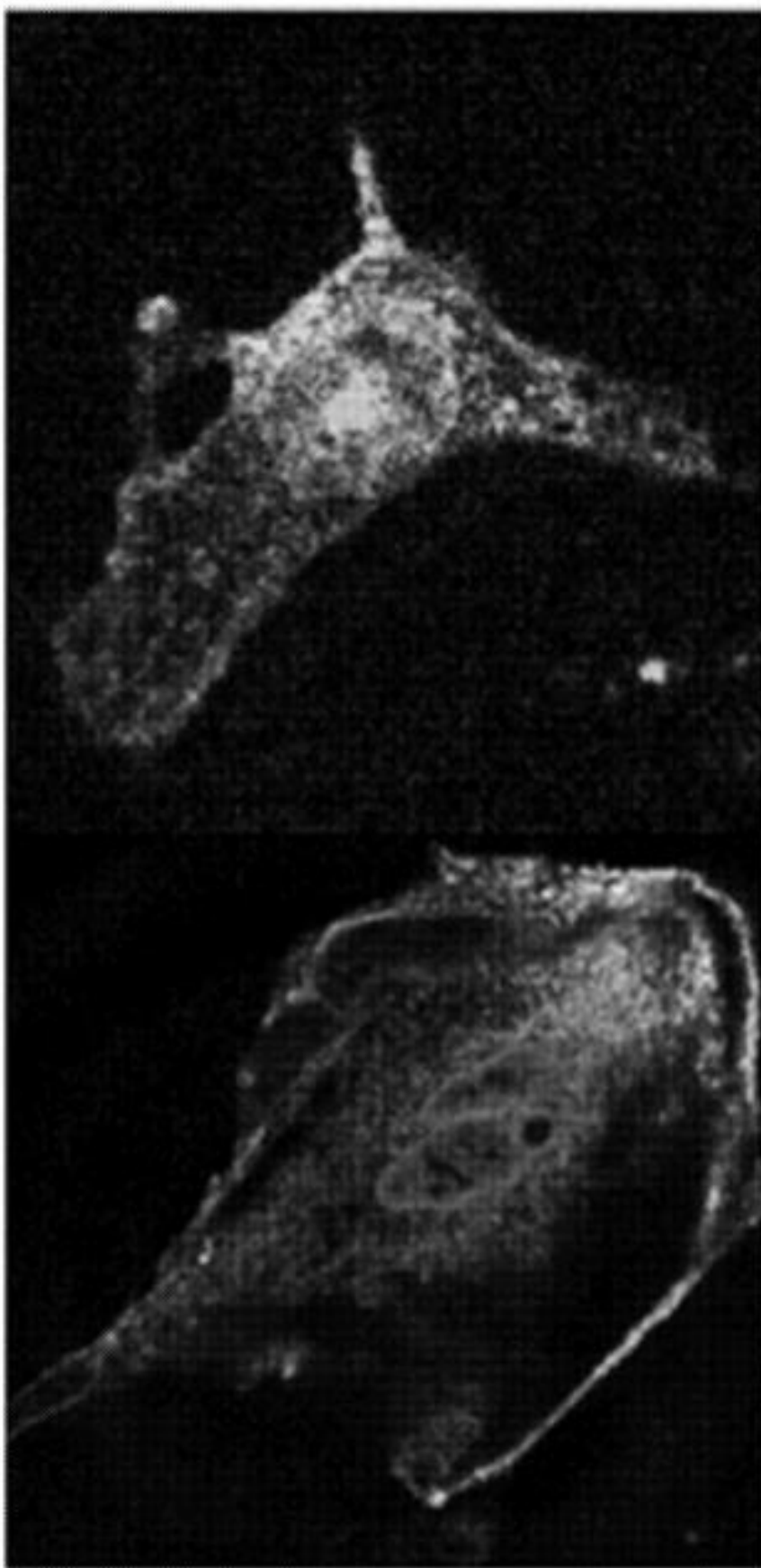


Figura 16

Figura 17



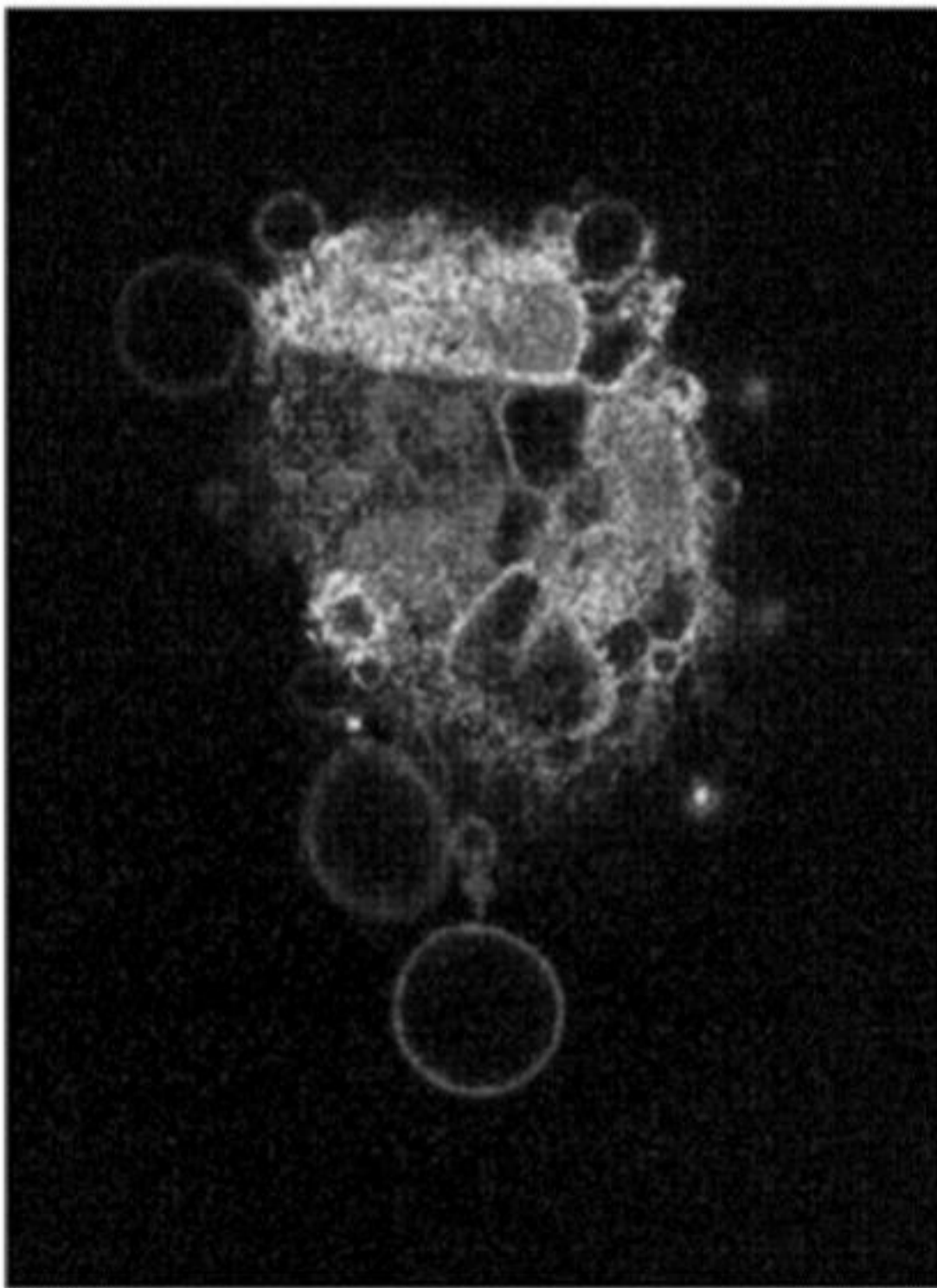


Figura 18

Figura 19

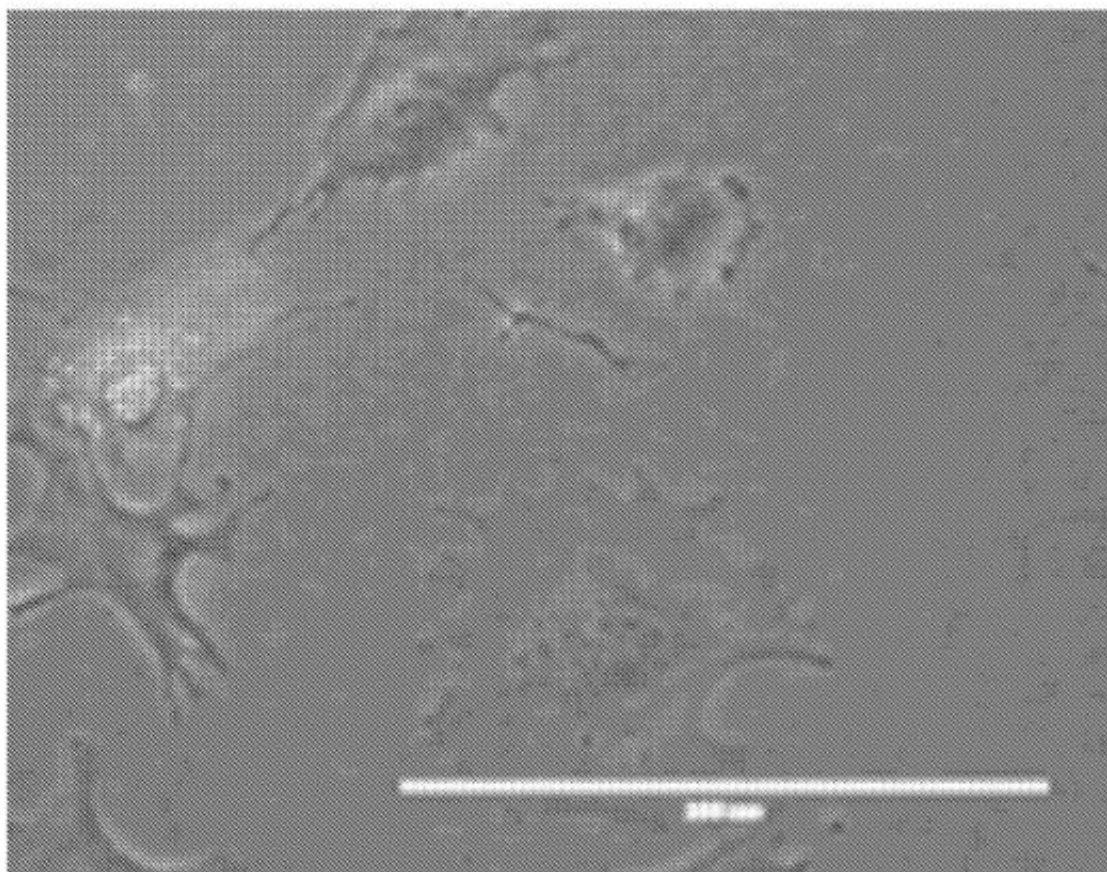


Figura 20

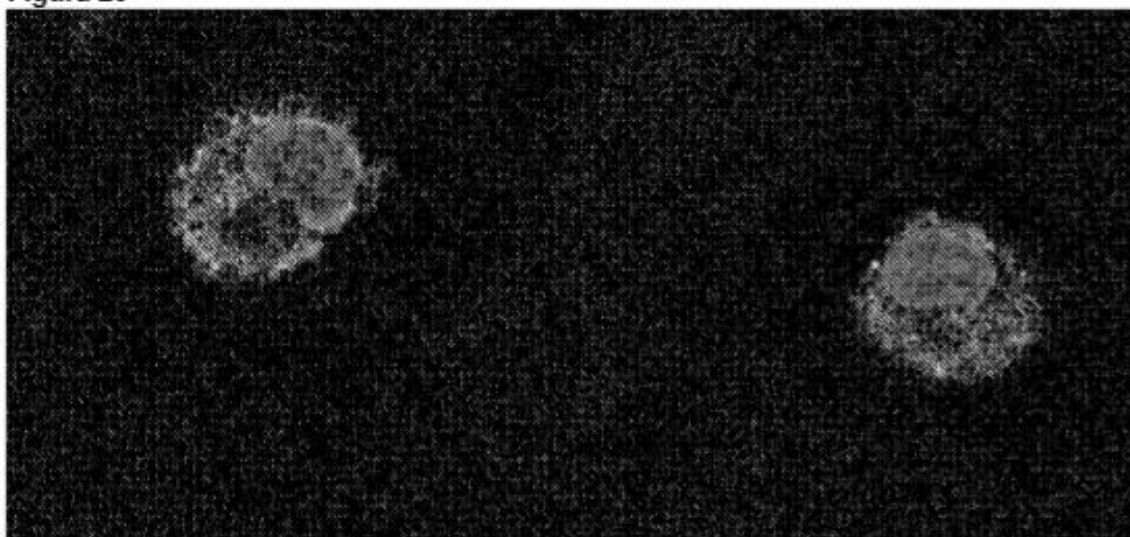


Figura 21

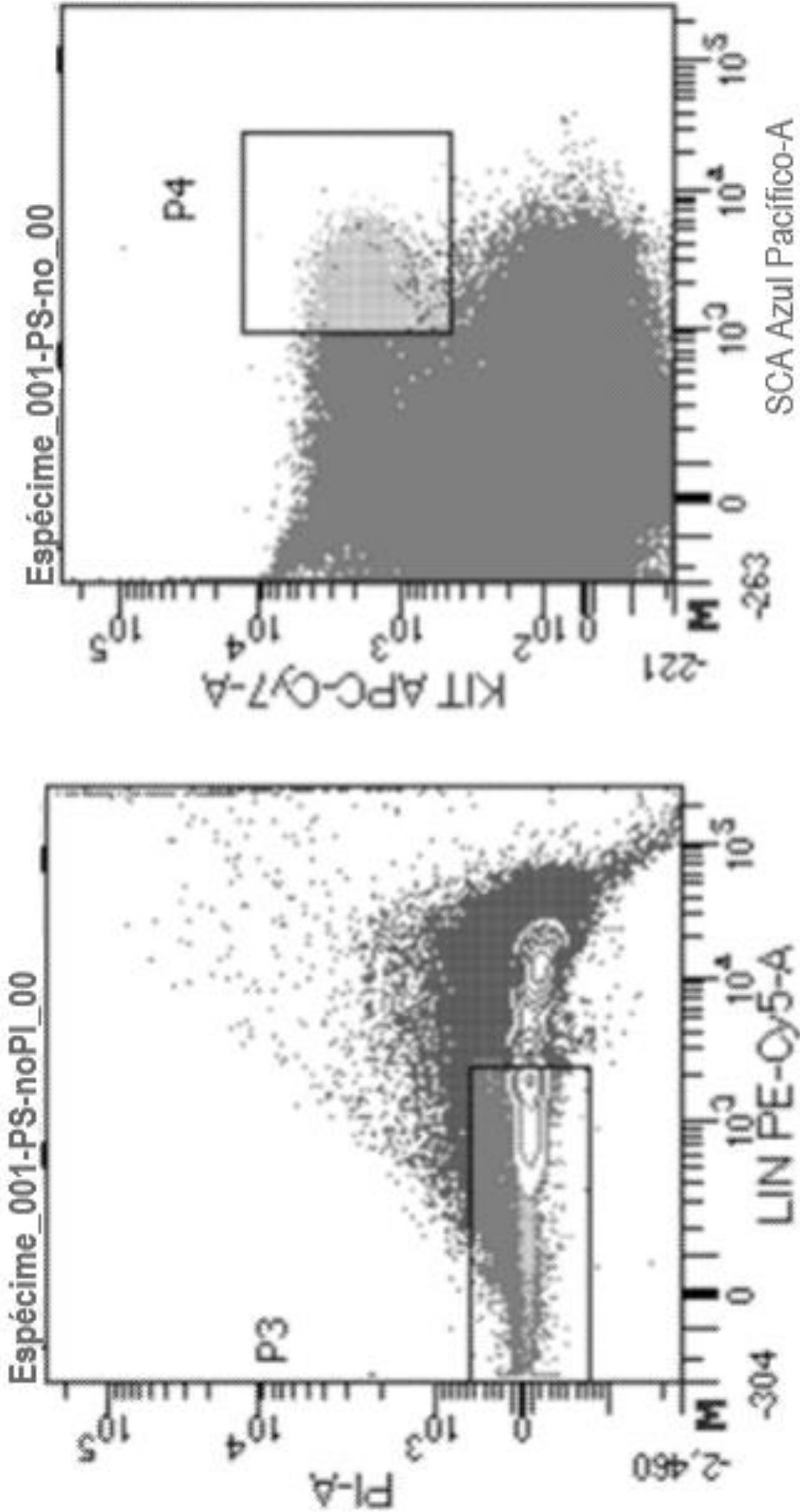


Figura 22

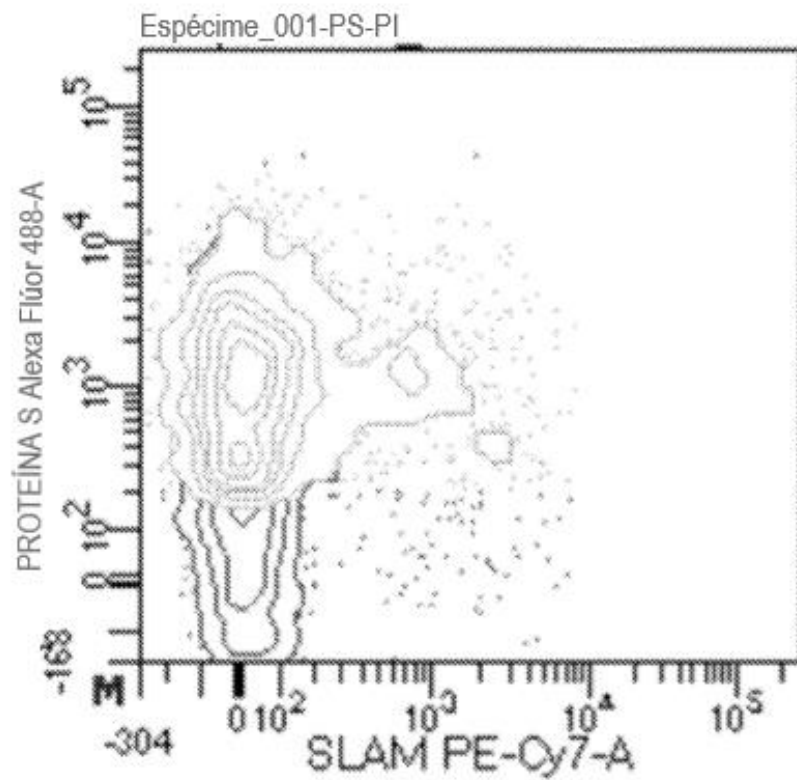


Figura 23

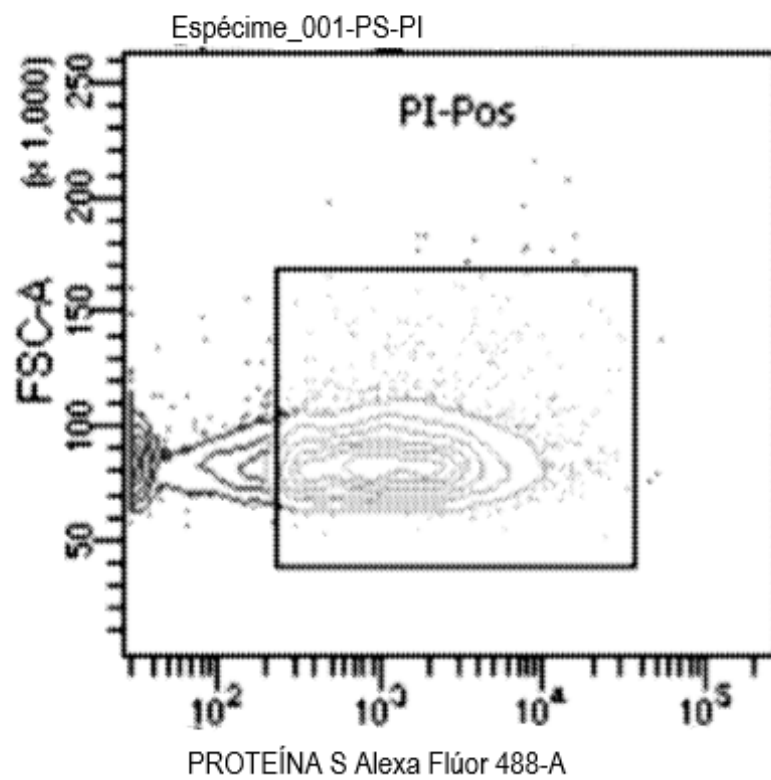


Figura 24

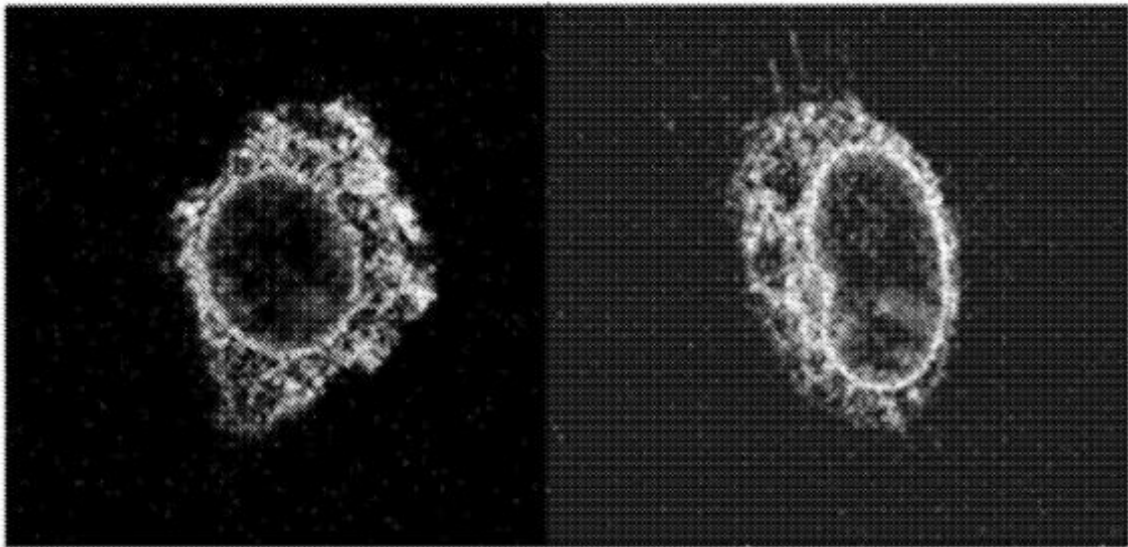


Figura 25

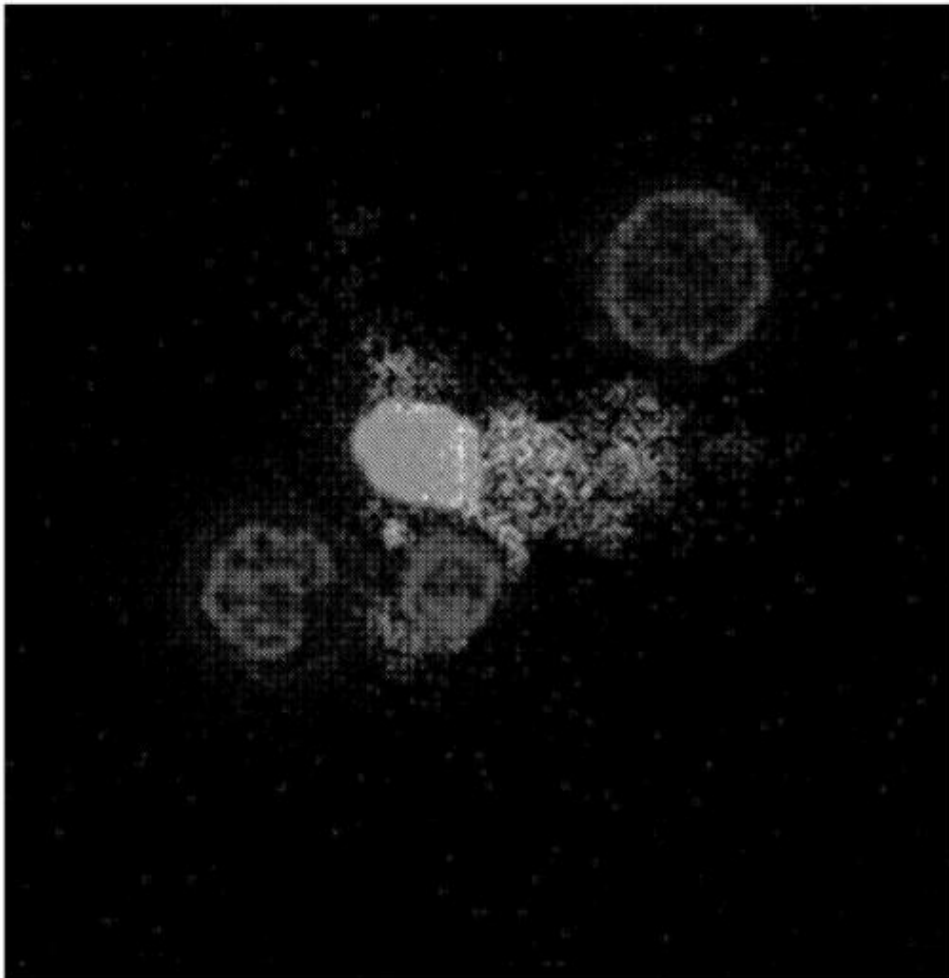
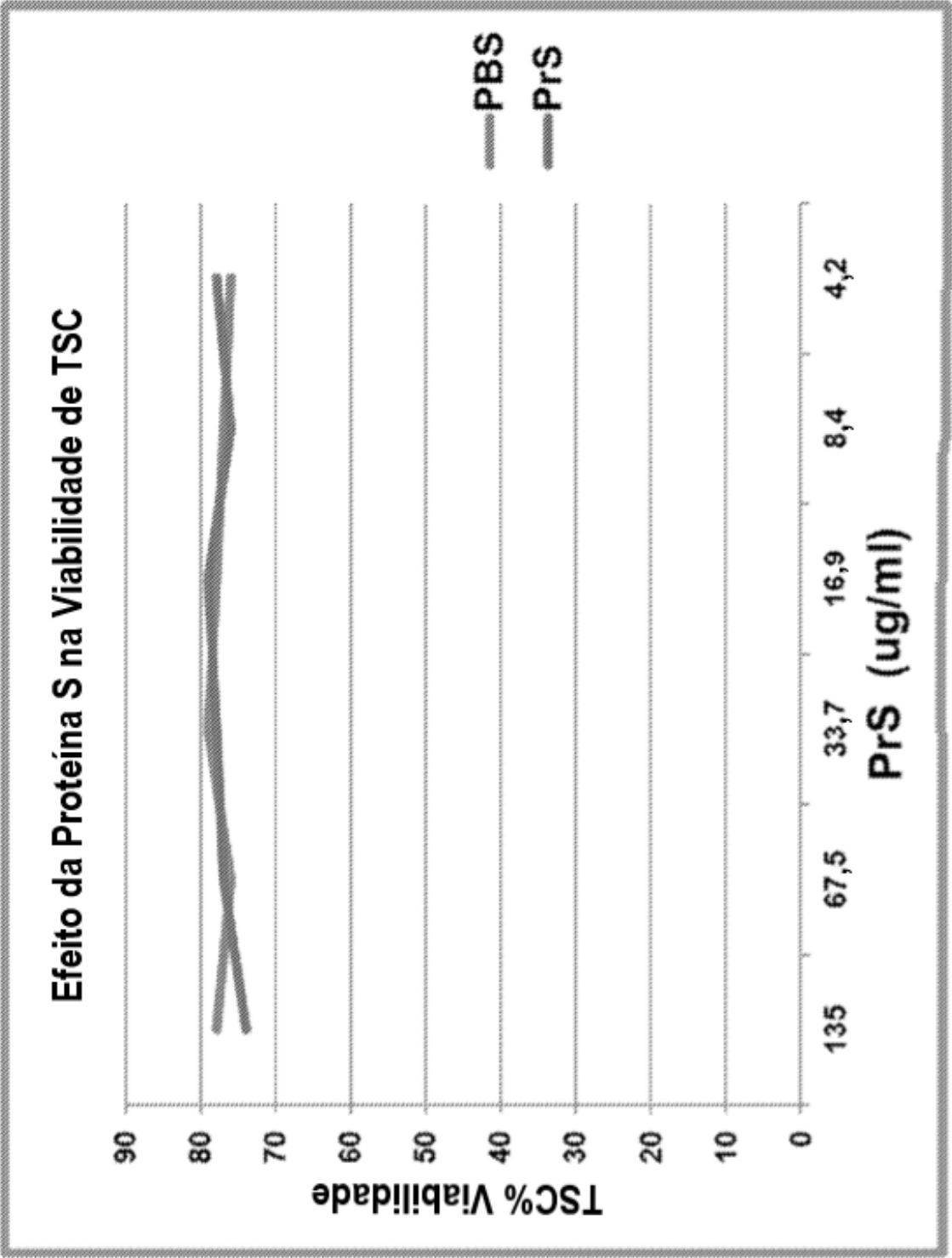


Figura 26



RESUMO

“ENTREGA DE CARGAS ÚTEIS A CÉLULAS-TRONCO”

A presente divulgação se refere a um método de alvejar células-tronco, em particular células-tronco não apoptóticas, utilizando um domínio de GLA, capaz de se ligar à fosfatidil serina exposta à superfície.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: OS.4424_Listagem de sequências.txt
- Data de Geração do Código: 27/02/2020
- Hora de Geração do Código: 17:38:20
- Código de Controle:
 - Campo 1: A279EE3B03BE450C
 - Campo 2: A9493C2A62034001