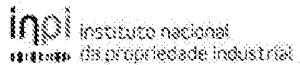

(11) Número de Publicação: **PT 1625209 E**



(51) Classificação Internacional:

C07K 14/475 (2013.01) **C07K 14/505** (2013.01)
C07K 14/555 (2013.01) **C07K 14/56** (2013.01)
C07K 14/565 (2013.01) **C07K 14/745** (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01) **C12N 9/64** (2013.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2004.05.06**

(30) Prioridade(s): **2003.05.06 US 469600 P**
2003.07.17 US 487964 P
2004.01.26 US 539207 P

(43) Data de publicação do pedido: **2006.02.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.07.17**
204/2013

(73) Titular(es):

BIOGEN IDEC HEMOPHILIA INC.
9 FOURTH AVENUE WALTHAM, MA 02451 US

(72) Inventor(es):

DANIEL S. RIVERA US
ROBERT T. PETERS US
ALAN J. BITONI US
ADAM R. MEZO US
JAMES M. STATTEL US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **HÍBRIDOS MONÔMERO-DÍMERO QUIMÉRICOS DE IMUNOGLOBULINA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UMA PROTEÍNA HÍBRIDA MONÔMERO-DÍMERO QUIMÉRICA ONDE A DITA PROTEÍNA COMPREENDE UMA PRIMEIRA E UMA SEGUNDA CADEIA DE POLIPEPTÍDEOS, A DITA PRIMEIRA CADEIA DE POLIPEPTÍDEO COMPREENDE PELO MENOS UMA PORÇÃO DE UMA REGIÃO CONSTANTE DE IMUNOGLOBULINA E UMA MOLÉCULA BIOLOGICAMENTE ATIVA, E A DITA SEGUNDA CADEIA DE POLIPEPTÍDEO COMPREENDENDO PELO MENOS UMA PORÇÃO DE UMA REGIÃO CONSTANTE DE IMUNOGLOBULINA SEM A MOLÉCULA BIOLOGICAMENTE ATIVA DA PRIMEIRA CADEIA. A INVENÇÃO REFERESE TAMBÉM A PROCESSOS DE USO E PROCESSOS DE FABRICAÇÃO DE PROTEÍNA HÍBRIDA MONÔMERO-DÍMERO QUIMÉRICA DA INVENÇÃO.

RESUMO

HÍBRIDOS MONÔMERO-DÍMERO QUIMÉRICOS DE IMUNOGLOBULINA

A presente invenção refere-se a uma proteína híbrida monômero-dímero quimérica onde a dita proteína compreende uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, a dita primeira cadeia de polipeptídeo compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e uma molécula biologicamente ativa, e a dita segunda cadeia de polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina sem a molécula biologicamente ativa da primeira cadeia. A invenção refere-se também a processos de uso e processos de fabricação de proteína híbrida monômero-dímero quimérica da invenção.

DESCRIÇÃO

HÍBRIDOS MONÔMERO-DÍMERO QUIMÉRICOS DE IMUNOGLOBULINA

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se geralmente a proteínas quiméricas terapêuticas, compreendidas por duas cadeias de polipeptídeo, onde a primeira cadeia é compreendida por uma molécula terapêutica biologicamente ativa e a segunda cadeia não é compreendida pela molécula terapêutica biologicamente ativa da primeira cadeia. Mais especificamente, a invenção refere-se a proteínas quiméricas, compreendidas por duas cadeias de polipeptídeos, onde ambas as cadeias são compreendidas por pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina onde a primeira cadeia é modificada para ainda compreender uma molécula biologicamente ativa, e a segunda cadeia não é assim modificada. A invenção, assim refere-se a uma proteína quimérica que é um híbrido monômero-dímero, isto é, uma proteína quimérica tendo um aspecto dimérico e um aspecto monomérico, onde o aspecto dimérico refere-se ao fato de que ela é compreendida por duas cadeias de polipeptídeos cada uma compreendida por uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e onde o aspecto monomérico refere-se ao fato de que somente uma das duas cadeias é compreendida por uma molécula terapêutica biologicamente ativa. A Figura 1 ilustra um exemplo de um híbrido monômero-dímero onde a molécula biologicamente ativa é eritropoietina (EPO) e a porção de uma região constante de imunoglobulina é uma região Fc IgG.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Imunoglobulinas são compreendidas por quatro cadeias de polipeptídeo, duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, que se associam através de ligações dissulfeto para formação de tetrâmeros. Cada cadeia é 5 ainda compreendida por uma região variável e uma região constante. As regiões variáveis mediam reconhecimento e ligação de antígeno, enquanto as regiões constantes, particularmente as regiões constantes de cadeia pesada, mediam uma variedade de funções efetoras, por exemplo, ligação de complemento e ligação de receptor de Fc (ver, por exemplo, patentes US N°s 6,086,875; 5,624,821; 5,116,964).

A região constante é ainda compreendida por domínios representados domínios CH (pesado constante) (CH1, CH2, etc.). Dependendo do isotipo (isto é, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) a região constante pode ser compreendida por três ou quatro domínios CH. Algumas regiões constantes de isotipos (por exemplo, IgG) também contêm uma região gonzo (Janeway *et al.* 2001, *Imunobiology*, Garland Publishing, N.Y., N.Y.

A criação de proteínas quiméricas compreendidas por regiões constantes de imunoglobulina ligadas a uma proteína de interesse, ou seu fragmento, foi descrita (ver, por exemplo, patentes US N°s 5,480,981 e 5,808,029; Gascoigne *et al.* 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2936; Capon *et al.* 1989, *nature* 337:525; Traunecker *et al.* 1989, *Nature* 339:68; Zettmeissl *et al.* 1990, *ADN Cell. Biol. USA* 9:347; Byrn *et al.* 1990, *Nature* 344:667; Watson *et al.* 1990, *J. Cell Biol.* 110:2221; Watson *et al.* 1991, *Nature* 349:164; Aruffo *et al.* 1990, *Cell* 61:1303; Linsley *et al.* 1991, *J. Exp. Med.* 173:721; Linsley *et al.* 1991, *J. Exp. Med.* 174:561; Stamenkovic *et al.*, 1991, *Cell* 66:1133; Ashkenazi *et al.* 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535; Lesslauer *et al.* 1991, *Eur. J. Immunol.* 27:2883; Peppel *et al.* 1991,

J. Exp. Med. 174:1483; Bennett *et al.* 1991, J. Biol. Chem. 266:23060; Kurschner *et al.* 1992, J. Biol. Chem. 267:9354; Chalupny *et al.* 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. 89:10360; Ridgway and Gorman, 1991, J. Cell. Biol. 115, Abstract N° 1448: Zheng *et al.* 1995, J. Immun. 154:5590). Estas moléculas usualmente possuem a atividade biológica associada com a molécula de interesse ligada assim como a função efetora, ou alguma outra característica associada à região constante de imunoglobulina (por exemplo, estabilidade biológica, secreção celular).

A porção Fc de uma região constante de imunoglobulina, dependendo do isotipo de imunoglobulina pode incluir os domínios CH2, CH3 e CH4, assim como a região gôno. Proteínas quiméricas compreendendo uma porção Fc de uma imunoglobulina outorgam várias propriedades desejáveis sobre uma proteína quimérica incluindo aumentada estabilidade, aumentada meia vida de soro (ver Capon *et al.* 1989, Nature 337:525) assim como ligação a receptores de Fc como o receptor de Fc neonatal (FcRn) (patentes US N°s 6 086 875, 6 485 726, 6 030 613; WO 03/077834; US2003-0235536A1).

FcRn é ativo em tecido epitelial adulto e expresso no lúmen dos intestinos, vias aéreas pulmonares, superfícies nasais, superfícies vaginais, superfícies de cólon e reto (patente US N° 6 485 726). Proteínas quiméricas compreendidas por parceiros de ligação de FcRn (por exemplo, IgG, fragmentos Fc) podem ser efetivamente lançadas através de barreiras epiteliais por FcRn, assim provendo um meio não-invasivo para administrar sistematicamente uma desejada molécula terapêutica. Adicionalmente, proteínas quiméricas compreendendo um parceiro de ligação de FcRn são endocitosadas por células expressando o FcRn. Mas ao invés

de serem marcadas para degradação, estas proteínas quiméricas são recicladas novamente em circulação, assim aumentando a meia-vida *in vivo* destas proteínas.

Porções de regiões constantes de imunoglobulina, por exemplo, parceiros de ligação de FcRn tipicamente associam-se, via ligações dissulfeto e outras interações não-específicas, uns com os outros para formação de dímeros e multímeros de ordem superior. A presente invenção é baseada em parte na surpreendente descoberta de que transcritose de proteínas quiméricas compreendidas por parceiros de ligação de FcRn parece ser limitada pelo peso molecular da proteína quimérica, com espécies de maior peso molecular sendo transportadas menos eficientemente.

Proteínas quiméricas compreendidas por moléculas biologicamente ativas, uma vez administradas, tipicamente interagirão com uma molécula ou célula alvo. A presente invenção é ainda baseada em parte na surpreendente descoberta de que híbridos monômero-dímero, com uma molécula biologicamente ativa, mas duas porções de uma região constante de imunoglobulina, por exemplo, dois parceiros de ligação de FcRn, funcionam e podem ser transportados mais efetivamente que homodímeros, também referidos aqui simplesmente como “dímeros” ou multímeros de ordem superior com duas ou mais cópias da molécula biologicamente ativa. Isto é devido em parte ao fato de que proteínas quiméricas, compreendidas por duas ou mais moléculas biologicamente ativas, que existem como dímeros e multímeros de ordem superior, podem ser estereometricamente impedidas de interagirem com sua molécula ou célula alvo, devido à presença das duas ou mais moléculas biologicamente ativas em grande proximidade uma da outra e que a molécula

biologicamente ativa pode ter uma alta afinidade por si mesma.

De acordo com um aspecto a presente invenção provê proteínas quiméricas compreendidas por uma molécula biologicamente ativa que é transportada através de barreira de epitélio. Um adicional aspecto da invenção provê proteínas quiméricas compreendidas por pelo menos uma molécula biologicamente ativa que é capaz de interagir com sua molécula ou célula alvo com pequeno ou nenhum impedimento estéreo ou auto-agregação.

Os aspectos da invenção provêm proteínas quiméricas compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, a primeira cadeia compreendendo pelo menos uma porção de região constante de imunoglobulina, onde a porção de uma região constante de imunoglobulina foi modificada para incluir uma molécula biologicamente ativa e a segunda cadeia compreendendo pelo menos uma porção de região constante de imunoglobulina, onde a porção de uma região constante de imunoglobulina não foi modificada para incluir a molécula biologicamente ativa da primeira cadeia.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente descrição refere-se a uma proteína quimérica compreendendo uma molécula biologicamente ativa e duas moléculas de pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina. A proteína quimérica é capaz de interagir com uma molécula ou célula alvo com menos impedimento estéreo comparada a uma proteína quimérica compreendida por pelo menos duas moléculas biologicamente ativas e pelo menos uma porção de duas regiões constantes de imunoglobulina. A presente descrição também refere-se a

uma proteína quimérica compreendendo pelo menos uma molécula biologicamente ativa e duas moléculas de pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina que é transportada através de uma barreira de epitélio mais eficientemente que um correspondente homodímero, isto é, onde ambas cadeias estão ligadas à mesma molécula biologicamente ativa. A presente divulgação, assim refere-se a uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeo ligadas, onde a dita primeira cadeia compreende uma molécula biologicamente ativa e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e a dita segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, mas nenhuma região variável de imunoglobulina e sem qualquer molécula biologicamente ativa ligada.

A presente divulgação refere-se a uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeo ligadas, onde a dita primeira cadeia compreende uma molécula biologicamente ativa e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e a dita segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina numa região variável de imunoglobulina ou qualquer molécula biologicamente ativa e onde a dita segunda cadeia não está ligada covalentemente a qualquer molécula tendo um peso molecular maior que 1 kD, 2 kD, 5 kD, 10 kD, ou 20 kD. Numa modalidade, a segunda cadeia não está covalentemente ligada a qualquer molécula tendo um peso molecular maior que 0-2 kD. Numa modalidade, a segunda cadeia não está covalentemente ligada a qualquer molécula tendo um peso molecular maior que 5-10 kD. Numa modalidade, a segunda cadeia não está covalentemente ligada a qualquer molécula tendo um peso molecular maior que 15-20 kD.

A presente divulgação refere-se a uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos ligada, onde a dita primeira cadeia compreende uma molécula biologicamente ativa e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e a dita segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina não ligada covalentemente a qualquer outra molécula exceto a porção de uma imunoglobulina da dita primeira cadeia de polipeptídeo.

A presente divulgação refere-se a uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos ligada, onde a dita primeira cadeia compreende uma molécula biologicamente ativa e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e a dita segunda cadeia consiste em pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e opcionalmente um marcador de afinidade.

A presente divulgação refere-se a uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos ligada, onde a dita primeira cadeia compreende uma molécula biologicamente ativa e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e a dita segunda cadeia consiste essencialmente em pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e opcionalmente um marcador de afinidade.

A presente divulgação refere-se a uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos ligada, onde a dita primeira cadeia compreende uma molécula biologicamente ativa e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e a dita segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma

região constante de imunoglobulina numa região variável de imunoglobulina ou qualquer molécula biologicamente ativa e opcionalmente uma molécula com um peso molecular de menos que 10 kD, 5 kD, 2 kD ou 1 kD. Numa modalidade, a segunda cadeia compreende uma molécula de menos que 15-20 kD. Numa modalidade, a segunda cadeia compreende uma molécula de menos que 5-10 kD. Numa modalidade, a segunda cadeia compreende uma molécula de menos que 1-2 kD.

A presente divulgação refere-se a uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde a dita primeira cadeia compreende uma molécula biologicamente ativa, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e pelo menos um primeiro domínio, o dito primeiro domínio tendo pelo menos um parceiro de ligação específico, e onde a dita segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e pelo menos um segundo domínio, onde o dito segundo domínio é um parceiro de ligação específico do dito primeiro domínio, sem qualquer região variável de imunoglobulina ou uma molécula biologicamente ativa.

A presente divulgação refere-se a um processo de fabricação de uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeo não são idênticas, o dito processo compreendendo transfecção de uma célula com um primeiro constructo de ADN compreendendo uma molécula de ADN codificando uma primeira cadeia de polipeptídeo compreendendo uma molécula biologicamente ativa e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e opcionalmente um ligante, e um segundo constructo de ADN compreendendo uma molécula de ADN

codificando uma segunda cadeia de polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina sem qualquer molécula biologicamente ativa ou uma região variável de imunoglobulina, e opcionalmente um ligante, cultura de células sob condições tais que a cadeia de polipeptídeo codificada pelo primeiro constructo de ADN seja expressa e a cadeia de polipeptídeo codificada pelo segundo constructo de ADN seja expressa e isolamento de híbridos monômero-dímero compreendidos pela cadeia de polipeptídeo codificada pelo primeiro constructo de ADN e a cadeia de polipeptídeo codificada pelo segundo constructo de ADN.

A presente divulgação refere-se a um processo de fabricação de uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeo não são idênticas, e onde a dita primeira cadeia de polipeptídeos compreende uma molécula biologicamente ativa, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e pelo menos um primeiro domínio, o dito primeiro domínio, tendo pelo menos um parceiro de ligação específico, e onde a dita segunda cadeia de polipeptídeo compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e um segundo domínio, onde o dito segundo domínio, é um parceiro de ligação específico do dito primeiro domínio, sem qualquer molécula biologicamente ativa ou uma região variável de imunoglobulina, o dito processo compreendendo transfecção de uma célula com um primeiro constructo de ADN compreendendo uma molécula de ADN codificando a dita primeira cadeia de polipeptídeo e um segundo constructo de ADN compreendendo uma molécula de ADN codificando a dita segunda cadeia de polipeptídeo, cultura de células sob condições tais que a cadeia de polipeptídeo codificada pelo

primeiro constructo de ADN seja expressa e a cadeia de polipeptídeo codificada pelo segundo constructo de ADN seja expressa e isolamento de híbridos monômero-dímero compreendidos pela cadeia de polipeptídeo codificada pelo primeiro constructo de ADN e cadeia de polipeptídeo codificada pelo segundo constructo de ADN.

A presente divulgação refere-se a um processo de fabricação de uma proteína quimérica da invenção o dito processo compreendendo transfecção de uma célula com um primeiro constructo de ADN compreendendo uma molécula de ADN codificando uma primeira cadeia de polipeptídeo compreendendo uma molécula biologicamente ativa e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e opcionalmente um ligante, cultura de célula sob condições tais que a cadeia de polipeptídeo codificada pelo primeiro constructo de ADN seja expressa, isolamento de cadeia de polipeptídeo codificada pelo primeiro constructo de ADN e transfecção de uma célula com um segundo constructo de ADN compreendendo uma molécula de ADN codificando uma segunda cadeia de polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina sem qualquer molécula biologicamente ativa ou região variável de imunoglobulina, cultura de célula sob condições tais que a cadeia de polipeptídeo codificada pelo segundo constructo de ADN seja expressa, isolamento de cadeia de polipeptídeo codificada pelo segundo constructo de ADN, combinação de cadeia de polipeptídeo codificada pelo primeiro constructo de ADN e a cadeia de polipeptídeo codificada pelo segundo constructo de ADN sob condições tais que híbridos monômero-dímero compreendendo a cadeia de polipeptídeo codificada pelo primeiro constructo de ADN e a cadeia de polipeptídeo codificada pelo segundo constructo de ADN se formam, e isolamento dos ditos híbridos monômero-dímero.

A presente divulgação refere-se a um processo de fabricação de uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeos não são idênticas, o dito processo compreendendo transfecção de uma célula com um constructo de ADN compreendendo uma molécula de ADN codificando uma cadeia de polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, cultura de células sob condições tais que a cadeia de polipeptídeo codificada pelo constructo de ADN é expressa com uma cisteína terminal N de modo que dímeros da cadeia de polipeptídeo se formam e isolamento de dímeros compreendidos por duas cópias da cadeia de polipeptídeo codificada pelo constructo de ADN e reagindo quimicamente os dímeros isolados com uma molécula biologicamente ativa, onde a dita molécula biologicamente ativa tem um tioéster término C, sob condições tais que a molécula biologicamente ativa reage predominantemente com somente uma cadeia de polipeptídeo do dímero pelo que formando um híbrido monômero-dímero.

A presente divulgação refere-se a um processo de fabricação de uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeos não são idênticas, o dito processo compreendendo transfecção de uma célula com um constructo de ADN compreendendo uma molécula de ADN codificando uma cadeia de polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, cultura de células sob condições tais que a cadeia de polipeptídeo codificada pelo constructo de ADN seja expressa com uma cisteína terminal N de modo que dímeros das cadeias de polipeptídeo se formam, e isolamento de dímeros compreendidos por duas cópias da cadeia de

polipeptídeo codificada pelo constructo de ADN, e reagindo quimicamente os dímeros isolados com uma molécula biologicamente ativa, onde a dita molécula biologicamente ativa tem um tioéster término C, de modo que a molécula biologicamente ativa está ligada a cada cadeia do dímero, desnaturação de dímero compreendido pela porção da imunoglobulina ligada à molécula biologicamente ativa de modo que cadeias monoméricas se formam, combinação de cadeias monoméricas com uma cadeia de polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina numa molécula biologicamente ativa ligada à mesma, de modo que híbridos monômero-dímero se formam, e isolamento de híbridos monômero-dímero.

A presente divulgação refere-se a um processo de fabricação de uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeo não são idênticas, o dito processo compreendendo transfecção de uma célula com um constructo de ADN compreendendo uma molécula de ADN codificando uma cadeia de polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, cultura de células sob condições tais que a cadeia de polipeptídeo codificada pelo constructo de ADN é expressa como uma mistura de duas cadeias de polipeptídeos, onde a mistura compreende um polipeptídeo com uma cisteína terminal N, e um polipeptídeo com uma cisteína em grande proximidade do término N, isolamento de dímeros compreendidos pela mistura de cadeias de polipeptídeos codificadas pelo constructo de ADN e reagindo quimicamente os dímeros isolados com uma molécula biologicamente ativa, onde a dita molécula biologicamente ativa tem um tioéster ativo, de modo que pelo menos algum híbrido monômero-dímero

se forma e isolamento de híbrido monômero-dímero a partir da dita mistura.

A presente divulgação refere-se a um processo de tratamento de uma doença ou condição compreendendo administração de uma proteína quimérica da invenção pelo que tratando a doença ou condição.

Adicionais objetivos e vantagens da invenção serão mostrados em parte na descrição que se segue, e em parte serão óbvios a partir da descrição, ou podem ser aprendidos através de prática da invenção. Os objetivos e vantagens da invenção serão realizados e obtidos por meio dos elementos e combinações particularmente destacadas nas reivindicações anexas.

É para ser entendido que ambas, a descrição geral anterior e a seguinte descrição detalhada são exemplares e explanatórias somente e não são restritivas da invenção, como reivindicada.

Assim, com base na divulgação aqui contida, a presente invenção providencia uma proteína quimérica compreendendo uma primeira cadeia de polipéptidos e uma segunda cadeia de polipéptidos, em que a dita primeira cadeia de polipéptidos compreende um factor de coagulação e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina que é um receptor Fc neonatal (FcRn) parceiro de ligação e em que a dita segunda cadeia de polipéptidos consiste numa região constante de imunoglobulina, ou uma porção dos mesmo, é um parceiro de ligação FcRn, para uso num método de tratamento.

A presente invenção compreende ainda uma composição farmacêutica compreendendo a dita proteína quimérica e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

A presente invenção compreende ainda um primeiro polinucleotídeo que codifica a primeira cadeia polipeptídica da dita proteína quimérica e um segundo polinucleotídeo de codificação da segunda cadeia polipeptídica da dita proteína quimérica.

Outros aspectos e formas de realização da presente invenção são indicados nas reivindicações anexas.

Deve ser compreendido que ambas as descrições, a anterior e a descrição em detalhe que se segue, são exemplares e explicativas e não são restritivas da invenção, como reivindicada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um diagrama esquemático comparando a estrutura de um homodímero EPO-Fc, ou dímero, e a estrutura de um híbrido monômero-dímero Epo-Fc.

A Figura 2a é a sequência de aminoácidos do Fator VII-Fc de proteína quimérica. Incluído na sequência é o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula e o pró-peptídeo (negrito), que é reconhecido pela carboxilase e dependente de vitamina K que modifica o Fator VII para obter atividade total. A sequência é subsequentemente clivada por PACE para render Fator VII-Fc.

A Figura 2b é a sequência de aminoácidos do Fator IX-Fc de proteína quimérica. Incluído na sequência está o peptídeo

sinal (sublinhado) que é clivado pela célula e o pró-peptídeo (negrito) que é reconhecido pela carboxilase γ dependente de vitamina K que modifica o Fator IX para obter total atividade. A sequência é subsequentemente clivada por PACE para render Fator IX-Fc.

A Figura 2c é a sequência de aminoácidos da proteína quimérica IFN α -Fc. Incluído na sequência é o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula resultando na IFN α -Fc.

A Figura 2d é a sequência de aminoácidos da proteína quimérica 30 IFN α -Fc Δ ligante. Incluído na sequência é o peptídeo sinal (sublinhado) que é clivado pela célula resultando na IFN α -Fc Δ ligante.

A Figura 2e é a sequência de aminoácidos da proteína quimérica Flag-Fc. Incluído na sequência é o peptídeo sinal (sublinhado), que é activado pela célula resultando na Flag-Fc madura.

A Figura 2f é a sequência de aminoácidos da proteína quimérica Epo-CCA-Fc. Incluída na sequência é o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula resultando em Epo-CCA-Fc madura. Também mostrado em negrito é o domínio da espira espiralada ácida.

A Figura 2g é a sequência de aminoácidos da proteína quimérica CCS-Fc. Incluído na sequência é o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula resultando em CCS-fc madura. Também mostrado em negrito é o domínio espiral espiralado básico.

A Figura 2h é a sequência de aminoácidos da proteína quimérica Cys-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula resultando na Cys-fc madura. Quando esta sequência é produzida em células CHO uma percentagem das moléculas são incorretamente activadas pela peptidase sinal de modo que dois aminoácidos extras são deixados no término N, assim prevenindo a ligação de uma molécula biologicamente ativa com um tioéster terminal C (por exemplo, via ligação nativa). Quando estas espécies impropriamente clivadas dimerizam com a Cys-Fc clivada propriamente e são subsequentemente reagidas com moléculas biologicamente ativas com tioésteres terminais C, híbridos monômero-dímero se formam.

A Figura 2i é a sequência de aminoácidos da proteína quimérica IFN α -GS15-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado) que é clivado pela célula resultando em IFN α -GS15-Fc madura.

A Figura 2j é a sequência de aminoácidos da proteína quimérica Epo-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula resultando na Epo-Fc madura. Também mostrado em negrito está o ligante de 8 aminoácidos.

A Figura 3a é a sequência de ácidos nucleicos da proteína quimérica Fator VII-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado) e o pró-peptídeo (negrito) que é reconhecido pela carboxilase dependente de vitamina K que modifica o Fator VII para obter atividade total. A sequência traduzida é subsequentemente activada por PACE para render Fator VII-Fc maduro.

A Figura 3b é a sequência de ácidos nucleicos da proteína quimérica Fator IX-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado) e o pró-peptídeo (negrito) que é reconhecido pela carboxilase γ dependente de vitamina K que modifica o Fator IX para obter atividade total. A sequência traduzida é subsequentemente clivada por PACE para render Fator IX-Fc maduro.

A Figura 3c é a sequência de ácido nucleico da proteína quimérica IFN α -Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado), que é activado pela célula após tradução resultando na IFN α -Fc madura.

A Figura 3d é a sequência de ácidos nucleicos da proteína quimérica IFN α -Fc ligante. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado) que é activado pela célula após tradução resultando na IFN α -Fc Δ ligante madura.

A Figura 3e é a sequência de aminoácidos da proteína quimérica Flag-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula após tradução resultando na Flag-Fc madura.

A Figura 3f é a sequência de ácidos nucleicos da proteína quimérica Epo-CCA-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula após tradução resultando na Epo-CCA-Fc madura. É também mostrado em negrito o domínio espiral espiralado ácido.

A Figura 3g é a sequência de ácidos nucleicos da proteína quimérica CCS-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula após tradução resultando na CCS-Fc madura. Também mostrado em negrito é o domínio espiral espiralado básico.

A Figura 3h é a sequência de ácidos nucleicos da proteína quimérica Cys-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula após tradução resultando na Cys-Fc madura.

A Figura 3i é a sequência de ácidos nucleicos da proteína quimérica IFN α -GS15-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado) que é clivado pela célula após tradução resultando na IFN α -GS15-Fc madura.

A Figura 3j é a sequência de ácidos nucleicos da proteína quimérica Epo-Fc. Incluído na sequência está o peptídeo sinal (sublinhado), que é clivado pela célula após tradução resultando na Epo-Fc madura. É também mostrado em negrito uma sequência de ácidos nucleicos codificando o ligante de 8 aminoácidos.

A Figura 4 demonstra maneiras para formação de híbridos monômero-dímero através de ligação nativa.

A Figura 5a mostra a sequência de aminoácidos de Fc MESNA (SEQ ID N°: 4).

A Figura 5b mostra a sequência de ADN de Fc MESNA (SEQ ID N°: 5).

A Figura 6 compara atividade antiviral de IFN α homodímero (isto é, compreendido por 2 moléculas de IFN α) com um híbrido monômero-dímero IFN α (isto é, compreendido por uma molécula de IFN α).

A Figura 7 é uma comparação de atividade coagulante de um Fator VIIa-Fc híbrido monômero-dímero quimérico (uma

molécula de Fator VII) e um Fator VIIa-Fc homodímero quimérico (duas moléculas, de Fator VII).

A Figura 8 compara dosagem oral em ratos neonatais de um Fator VIIa-Fc híbrido monômero-dímero quimérico (uma molécula de Fator VII) e um Fator VIIa-Fc homodímero quimérico (duas moléculas de Fator VII).

A Figura 9 compara dosagem oral em ratos neonatais de um Fator IX-Fc híbrido monômero-dímero quimérico (uma molécula de Fator IX) com um homodímero quimérico.

A Figura 10 é um estudo de curso de tempo comparando um Fator IX-Fc híbrido monômero-dímero quimérico (uma molécula de Fator IX) administrado oralmente a ratos neonatais com um homodímero quimérico administrado oralmente.

A Figura 11 demonstra fármaco - cinéticas de dímero Epo-Fc comparado a híbrido monômero-dímero Epo-Fc em macacos cynomolgus após uma dose pulmonar simples.

A Figura 12 compara concentração em soro em macacos de híbrido monômero-dímero Epo-Fc administrado subcutaneamente com Aranesp™ (darbepoetina alfa) administrado subcutaneamente.

A Figura 13 compara concentração em soro em macacos de híbrido monômero-dímero Epo-Fc administrado intravenosamente com Aranesp™ (darbepoetina alfa) e Epogen™ (epoetina alfa) administrados intravenosamente.

A Figura 14 mostra um traço de uma coluna Mimetic Red 2™ (ProMetic Lifesciences, Inc., Wayne, NJ) e uma SDS-PAGE de frações a partir da coluna contendo híbrido monômero-dímero

EpoFc, dímero EpoFc, e Fc. Híbrido monômero-dímero EpoFc é encontrado em frações, 11, 12, 13, e 14. Dímero EpoFc é encontrado na fração 18. Fc é encontrado nas frações 1/2.

A Figura 15 mostra as fármaco-cinéticas de IFN β Fc com um ligante de 8 aminoácidos em macacos cynomolgus após uma dose pulmonar simples.

A Figura 16 mostra estimulação de neopterina em resposta ao homodímero IFN β -Fc e o híbrido monômero-dímero IFN β -Fc N297A em macacos cynomolgus.

A Figura 17a mostra a sequência de nucleotídeos de interferon β -Fc; a Figura 17b mostra a sequência de aminoácidos de interferon β -Fc.

A Figura 18 mostra a sequência de aminoácidos de T20(a); T21(b) e T1249(c).

DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO

A. Definições

Marcador de afinidade, como aqui usado, significa uma molécula ligada a uma segunda molécula de interesse, capaz de interagir com um específico parceiro de ligação para o propósito de isolamento ou identificação da dita segunda molécula de interesse.

Análogos de proteínas quiméricas da invenção, ou proteínas ou peptídeos substancialmente idênticos às proteínas quiméricas da invenção, como aqui usados, significam que uma sequência de aminoácidos relevante de uma proteína ou um peptídeo é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%,

98%, 99% ou 100% idêntica a uma dada sequência. A título de exemplo, tais sequências podem ser variantes derivadas de várias espécies, ou elas podem ser derivadas de uma dada sequência por truncção, supressão, substituição ou adição de aminoácido. A percentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos é determinada através de algoritmos de alinhamento padrões como, por exemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito em Altschul *et al.* 1990, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, o algoritmo de Needleman *et al.* 1970, *J. Mol. Biol.*, 48:444-453; o algoritmo de Meyers *et al.* 1988, *Computo Appl. Biosci.*, 4:11-17; ou Tatusova *et al.* 1999, *FEMS Microbiol. Lett.*, 174:247-250, etc. Tais algoritmos são incorporados nos programas BLASTN, BLASTP e "BLAST 2 Sequences" (ver www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Quando utilizando tais programas, os parâmetros default podem ser usados. Por exemplo, para sequências de nucleotídeos as seguintes fixações podem ser usadas para "BLAST 2 Sequences": programa BLASTN, prémio para emparelhamento 2, penalidade para desemparelhamento -2, folga aberta e folga de extensão penalidades 5 e 2, respectivamente, folga x_ retirada 50, espera 10, tamanho de palavra 11, filtro ligado. Para sequências de aminoácidos as seguintes fixações podem ser usadas para "BLAST 2 Sequences": programa BLASTP, matriz BLOSUM62, penalidades de folga aberta e folga de extensão de 11 e 1, respectivamente, folga x_ retirada 50, espera 10, tamanho de palavra 3, filtro LIGADO.

Biodisponibilidade, como aqui usado, significa a extensão e taxa nas quais uma substância é absorvida em um sistema vivo ou é feita disponível no sítio de atividade fisiológica.

Molécula biologicamente ativa, como aqui usado, significa uma molécula de não-imunoglobulina ou seu fragmento, capaz de tratar uma doença ou condição no corpo realizando uma função ou uma ação, ou estimulando ou respondendo a uma função, uma ação, ou uma reação, num contexto biológico (por exemplo, em um organismo, uma célula, ou um seu modelo *in vitro*). Moléculas biologicamente ativas podem compreender pelo menos um de polipeptídeos, ácidos nucleicos, moléculas pequenas como moléculas pequenas orgânicas ou inorgânicas.

Uma **proteína quimérica**, como aqui usado, refere-se a qualquer proteína compreendida por uma primeira sequência de aminoácidos derivada de uma primeira fonte, ligada, covalentemente ou não-covalentemente, a uma segunda sequência de aminoácidos derivada de uma segunda fonte, onde a primeira e segunda fontes não são idênticas. Uma primeira fonte e uma segunda fonte que não são idênticas podem incluir duas diferentes entidades biológicas, ou duas diferentes proteínas a partir da mesma entidade biológica, ou uma entidade biológica e uma entidade não-biológica. Uma proteína quimérica pode incluir, por exemplo, uma proteína derivada de pelo menos 2 fontes biológicas diferentes. Uma fonte biológica pode incluir qualquer sequência de aminoácidos ou ácidos nucleicos produzida não sinteticamente (por exemplo, uma sequência de ADNc ou genómico, um vetor plasmídeo ou viral, um virion nativo ou um mutante ou análogo, como ainda descrito aqui, de qualquer um dos acima). Uma fonte sintética pode incluir uma sequência de proteína ou ácido nucleico produzida quimicamente e não através de um sistema biológico (por exemplo, síntese em fase sólida de sequências de aminoácidos). Uma proteína quimérica também pode incluir uma proteína derivada de pelo menos 2 fontes sintéticas

diferentes ou uma proteína derivada de pelo menos uma fonte biológica e pelo menos uma fonte sintética. Uma proteína quimérica também pode compreender uma primeira sequência de aminoácidos derivada de uma primeira fonte, ligada covalentemente ou não-covalentemente a um ácido nucleico, derivado de qualquer fonte ou uma molécula orgânica ou inorgânica pequena derivada de qualquer fonte. A proteína quimérica pode compreender uma molécula ligadora entre a primeira e segundas sequências de aminoácidos ou entre a primeira sequência de aminoácidos e o ácido nucleico, ou entre a primeira sequência de aminoácidos e a molécula pequena orgânica ou inorgânica.

Fator de coagulação, como aqui usado, significa qualquer molécula, ou seu análogo, ocorrendo naturalmente ou recombinantemente produzida que previne ou diminui a duração de um episódio de sangramento em um sujeito com uma desordem hemostática. Em outras palavras, significa qualquer molécula tendo atividade de coagulação.

Atividade de coagulação, como aqui usado, significa a habilidade de participar Numa cascata de reações bioquímicas que culmina na formação de um coágulo de fibrina e/ou reduz a seriedade, duração ou frequência de hemorragia ou episódio de sangramento.

Dímero como aqui usado refere-se a uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde as primeiras e segundas cadeias compreendem uma molécula biologicamente ativa, e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina. Um homodímero refere-se a um dímero onde ambas moléculas biologicamente ativas são idênticas.

Híbrido monômero-dímero ligado dimericamente refere-se a uma proteína quimérica compreendida por pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, por exemplo, um fragmento Fc de uma imunoglobulina, uma molécula biologicamente ativa, e um ligante que liga os dois juntos de modo que uma molécula biologicamente ativa está ligada a 2 cadeias de polipeptídeos, cada uma compreendendo uma porção de uma região constante de imunoglobulina. A Figura 4 mostra um exemplo de um híbrido monômero-dímero ligado dimericamente.

Constructo de ADN, como aqui usado, significa uma molécula de ADN, ou um clone de uma tal molécula, tanto de fita simples ou dupla que foi modificado através de intervenção humana para conter segmentos de ADN combinados Numa maneira que como um todo não pode de outro modo existir em natureza. Constructos de ADN contêm a informação necessária para direcionar a expressão de polipeptídeos de interesse. Constructos de ADN podem incluir promotores, aperfeiçoadores e terminadores de transcrição. Constructos de ADN contendo a informação necessária para direcionar a secreção de um polipeptídeo também conterão pelo menos uma sequência sinal secretora.

Domínio, como aqui usado; significa uma região de um polipeptídeo (incluindo proteínas como este termo é definido) tendo alguma característica física distinta ou papel incluindo por exemplo, uma estrutura dobrada independentemente composta de uma seção de uma cadeia de polipeptídeo. Um domínio pode conter a sequência da característica física distintiva do polipeptídeo ou pode conter um fragmento da característica física que retém suas características Ligantes (isto é, ele pode se ligar a um segundo domínio). Um domínio pode estar associado com outro

domínio. Em outras palavras, um primeiro domínio pode se ligar naturalmente a um segundo domínio.

Um **fragmento**, como aqui usado, refere-se a um peptídeo ou polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de pelo menos 2 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 5 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 15 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 25 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 40 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 50 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 100 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 200 resíduos de aminoácidos contíguos ou qualquer supressão ou truncação de uma proteína, peptídeo ou polipeptídeo.

Hemóstase, como aqui usado, significa a parada de sangramento ou hemorragia; ou a paragem de fluxo de sangue através de um vaso sanguíneo ou parte de corpo.

Desordem hemostática, como aqui usado, significa uma condição adquirida ou herdada geneticamente caracterizada por uma tendência a hemorragia, tanto espontaneamente ou como um resultado de trauma, devido a uma habilidade prejudicada ou inabilidade para formar um coágulo de fibrina.

Ligada, como aqui usado, refere-se a uma primeira sequência de ácido nucleico ligada covalentemente a uma segunda sequência de ácido nucleico. A primeira sequência de ácido nucleico pode estar diretamente ligada ou justaposta à segunda sequência de ácidos nucleicos ou alternativamente uma sequência interveniente pode unir covalentemente a

primeira sequência à segunda sequência. Ligado como aqui usado também pode referir-se a uma primeira sequência de aminoácidos ligada covalentemente ou não-covalentemente a uma segunda sequência de aminoácidos. A primeira sequência de aminoácidos pode estar ligada diretamente ou justaposta à segunda sequência de aminoácidos ou alternativamente uma sequência interveniente pode ligar covalentemente a primeira sequência de aminoácidos à segunda sequência de aminoácidos.

Operativamente ligada, como aqui usado, significa uma primeira sequência de ácidos nucleicos ligada a uma segunda sequência de ácidos nucleicos de modo que ambas sequências sejam capazes de serem expressas como uma proteína ou peptídeo biologicamente ativo.

Polipeptídeo, como aqui usado, refere-se a um polímero de aminoácidos e não refere-se a um específico comprimento do produto; assim, peptídeos, oligopeptídeos, e proteínas estão incluídos na definição de polipeptídeos. Este termo não exclui modificações pós-expressão do polipeptídeo, por exemplo, glicosilação, acetilação, fosforilação, pegilação, adição de uma metade lipídeo, ou a adição de qualquer molécula orgânica ou inorgânica. Incluídos na definição, estão por exemplo, polipeptídeos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais) e polipeptídeos com ligações substituídas, assim como outras modificações conhecidas na técnica, ocorrendo naturalmente e ocorrendo não naturalmente.

Alta rigorosidade, como aqui usado, inclui condições facilmente determinadas por aqueles versados na técnica baseado em, por exemplo, o comprimento do ADN. Geralmente,

tais condições são definidas em Sam-brook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed. Vol. 1, pp. 1.101104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), e inclui uso de uma solução de pré-lavagem para os filtros de nitrocelulose 5XSSC, SOS 0,5%, EOTA 1,0 mM (pH 8,0), condições de hibridização de formamida 50%, 6X SSC a 42°C (ou outra solução de hibridização similar, tal como solução de Stark, em formamida 50% a 42°C, e com lavagem em aproximadamente 68°C, 0,2 x SSC, SDS 0,1%). Aqueles versados na técnica reconhecerão que a temperatura e concentração de sal de solução de lavagem podem ser ajustadas quando necessário de acordo com fatores, tais como o comprimento da sonda.

Rigorosidade moderada, como aqui usado, inclui condições que podem ser facilmente determinadas por aqueles versados na técnica baseado em, por exemplo, o comprimento do ADN. As condições básicas são mostradas por Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), e incluem o uso de uma solução de pré-lavagem para os filtros de nitrocelulose 5X SSC, 0,5% SDS, EOTA 1,0 mM (pH 8,0), condições de hibridização de formamida 50%, 6X SSC a 42°C (ou outra solução de hibridização similar, como solução de Stark, em formamida 50% a 42°C), e condições de lavagem de 60°C, 0,5X SSC, SDS 0,1%.

Uma **molécula inorgânica pequena**, como aqui usado significa uma molécula não contendo átomos de carbono e não sendo maior que 50kD.

Uma **molécula orgânica pequena**, como aqui usado significa uma molécula contendo pelo menos um átomo de carbono e não sendo maior que 50 kD.

Tratar, tratamento, tratando, como aqui usados significam, qualquer um do seguinte: a redução em seriedade de uma doença ou condição; a redução na duração de um curso de doença; a melhora de um ou mais sintomas associados com uma doença ou condição; a provisão de efeitos benéficos para um sujeito com uma doença ou condição, sem necessariamente cura de doença ou condição, a profilaxia de um ou mais sintomas associados com uma doença ou condição.

B. Aperfeiçoamentos Oferecidos Por Certas Formas de Realização da Invenção

A presente divulgação provê proteínas quiméricas (híbridos monómero-dímero) compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde a dita primeira cadeia compreende uma molécula biologicamente ativa e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e a dita segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina sem qualquer molécula biologicamente ativa ou região variável de uma imunoglobulina. A Figura 1 contrasta tradicionais dímeros de proteína de fusão com um exemplo do híbrido monômero-dímero da invenção. Neste exemplo, a molécula biologicamente ativa é EPO e a porção de uma imunoglobulina é região IgG Fc.

Como outras proteínas quiméricas compreendidas por pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, a presente divulgação provê proteínas quiméricas que proporcionam aperfeiçoada estabilidade e aumentada biodisponibilidade da proteína químérica comparada à molécula biologicamente ativa sozinha. Adicionalmente, entretanto, porque somente uma das duas cadeias compreende a molécula biologicamente ativa, a proteína químérica tem

um peso molecular menor que uma proteína quimérica onde todas as cadeias compreendem uma molécula biologicamente ativa e embora não desejando ser preso por qualquer teoria, isto pode resultar na proteína quimérica sendo mais facilmente transcritosada através de barreira de epitélio, por exemplo, através de ligação ao receptor de FcRn pelo que aumentando a meia-vida da proteína quimérica. Numa modalidade, a invenção assim provê um processo não-invasivo aperfeiçoado (por exemplo, via qualquer superfície de mucosa, tal como oralmente, bucalmente, sublingualmente, nasalmente, retalmente, vaginalmente, ou via pulmonar ou via ocular) de administração de uma proteína quimérica terapêutica da invenção. A presente divulgação assim provê processos de obtenção de níveis terapêuticos das proteínas quiméricas da invenção usando doses menos frequentes e menores comparadas a proteínas quiméricas descritas anteriormente (por exemplo, proteínas quiméricas compreendidas por pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e uma molécula biologicamente ativa, onde todas as cadeias da proteína quimérica compreendem uma molécula biologicamente ativa).

Numa outra modalidade, a invenção provê um processo invasivo, por exemplo, subcutâneo, intravenoso, de administração de uma proteína quimérica terapêutica da invenção. Administração invasiva da proteína quimérica terapêutica da invenção provê uma aumentada meia-vida da proteína quimérica terapêutica o que resulta em uso de doses menos frequentes e menores comparado a proteínas quiméricas descritas anteriormente (por exemplo, proteínas quiméricas compreendidas por pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e uma molécula biologicamente ativa, onde todas as cadeias da proteína quimérica compreendem uma molécula biologicamente ativa).

Ainda uma outra vantagem de uma proteína quimérica onde somente uma das cadeias compreende uma molécula biologicamente ativa é a aperfeiçoada acessibilidade da molécula biologicamente ativa para sua célula ou molécula alvo resultante de diminuído impedimento estéreo, diminuídas interações hidrofóbicas, diminuídas interações iónicas, ou diminuído peso molecular comparado a uma proteína quimérica onde todas as cadeias são compreendidas por uma molécula biologicamente ativa.

C. Proteínas Quiméricas

A presente divulgação refere-se a proteínas quiméricas compreendendo uma molécula biologicamente ativa, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e opcionalmente pelo menos um ligante. A porção de uma imunoglobulina terá ambos, um término N ou amino, e um término C ou carbóxi. A proteína quimérica pode ter a molécula biologicamente ativa ligada ao término N da porção de uma imunoglobulina. Alternativamente, a molécula biologicamente ativa pode estar ligada ao término C da porção de uma imunoglobulina. Numa modalidade, a ligação é uma ligação covalente. Numa outra modalidade, a ligação é uma ligação não covalente.

A proteína quimérica opcionalmente pode compreender pelo menos um ligante; assim, a molécula biologicamente ativa não tem de estar diretamente ligada à porção de uma região constante de imunoglobulina. O Ligante pode intervir entre a molécula biologicamente ativa e a porção de uma região constante de imunoglobulina. O ligante pode ser ligado ao término N da porção de uma região constante de imunoglobulina, ou o término C da porção de uma região constante de imunoglobulina. Se a molécula biologicamente

ativa é compreendida por pelo menos um aminoácido a molécula biologicamente ativa terá um término N e um término C e o Ligante pode ser ligado ao término N da molécula biologicamente ativa ou o término C da molécula biologicamente ativa.

A presente divulgação refere-se a uma proteína quimérica da fórmula $X-L_aF:F$ ou $F:F-L_a-X$, onde X é uma molécula biologicamente ativa, L é um ligante opcional, F é pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e, a é qualquer inteiro ou zero. A invenção também se refere a uma proteína quimérica da fórmula $T_a-X-L_a-F:F$ ou $T_a-F:F-L_a-X$, onde X é uma molécula biologicamente ativa, L é um ligante opcional, F é pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, a é qualquer inteiro ou zero, T é um segundo Ligante ou alternativamente um marcador que pode ser usado para facilitar purificação da proteína quimérica, por exemplo, um marcador FLAG, um marcador histidina, um marcador GST, um marcador de proteína de ligação maltose e (:) representa uma associação química, por exemplo, pelo menos uma ligação não-peptídeo. Em certas modalidades, a associação química, isto é, (:) é uma ligação covalente. Em outras modalidades, a associação química, isto é, (:) é uma interação não-covalente, por exemplo, uma interação iônica, uma interação hidrofóbica, uma interação hidrofílica, uma interação de Van der Waals, uma ligação de hidrogénio. Será entendido pelo técnico versado que quando a é igual a zero X estará diretamente ligado a F. Assim, por exemplo, a pode ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou mais que 5.

Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção compreende a sequência de aminoácidos de figura 2a (SEQ ID N°: 6). Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção

compreende a sequência de aminoácidos de figura 2b (SEQ ID N°: 8). Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção comprehende a sequência de aminoácidos de figura 2c (SEQ ID N°:10). Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção comprehende a sequência de aminoácidos de figura 2d (SEQ ID N°: 12). Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção comprehende a sequência de aminoácidos de figura 2e (SEQ ID N°: 14). Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção comprehende a sequência de aminoácidos de figura 2f (SEQ ID N°: 16). Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção comprehende a sequência de aminoácidos de figura 2g (SEQ ID N°: 18). Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção comprehende a sequência de aminoácidos de figura 2h (SEQ ID N°: 20). Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção comprehende a sequência de aminoácidos de figura 2i (SEQ ID N°: 22). Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção comprehende a sequência de aminoácidos de figura 2j (SEQ ID N°: 24). Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção comprehende a sequência de aminoácidos de figura 17b (SEQ ID N°: 27).

Com base na descrição que é providenciada acima, e na descrição contida neste documento, a presente invenção providencia proteínas quiméricas no âmbito da reivindicação 1 anexa.

1. Variantes de Proteína Quimérica

Derivados das proteínas quiméricas da invenção, incluindo as proteínas quiméricas da presente invenção, anticorpos contra as proteínas quiméricas da invenção e anticorpos contra parceiros ligantes das proteínas quiméricas da invenção são todos contempladas, e podem ser fabricadas através de alteração de suas sequências de aminoácidos por

substituições, adições, e/ou supressões/truncações ou através de introdução de modificação química que resulte em moléculas funcionalmente equivalentes. Será entendido por aqueles versados na técnica que certos aminoácidos Numa sequência de qualquer proteína podem ser substituídos com outros aminoácidos sem afetar adversamente a atividade da proteína.

Várias mudanças podem ser feitas nas sequências de aminoácidos das proteínas quiméricas da invenção ou sequências de ADN codificando as mesmas sem apreciável perda de sua atividade biológica, função ou utilidade. Derivados, análogos, ou mutantes resultantes de tais mudanças e o uso de tais derivados estão dentro do escopo da presente invenção. Numa modalidade específica, o derivado é funcionalmente ativo, isto é, capaz de exibir uma ou mais atividades associadas com as proteínas quiméricas da invenção, por exemplo, ligação de FcRn, inibição viral, hemostase, produção de células vermelhas de sangue. Muitos ensaios capazes de testarem a atividade de uma proteína químérica compreendendo uma molécula biologicamente ativa são conhecidos na técnica. Onde a molécula biologicamente ativa é um inibidor de VIH, atividade pode ser testada através de medição de atividade de transcriptase reversa usando processos conhecidos (ver, por exemplo, Barre-Sinoussi *et al.*, 1983, *Science* 220:868; Gallo *et al.* 1984, *Science* 224:500). Alternativamente, atividade pode ser medida através de medição de atividade fusogénica (ver, por exemplo, Nussbaum *et al.* 1994, *J. Virol.* 68(9): 5411). Onde a atividade biológica é hemostase, um ensaio StaClotFVlla- rTF pode ser realizado para avaliar atividade de derivados de Fator Vila (Johannessen *et al.* 2000, *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 11 :S159).

Substitutos para um aminoácido dentro de sequência podem ser selecionados a partir de outros membros da classe à qual o aminoácido pertence (ver Tabela 1). Além disso, vários aminoácidos são comumente substituídos com aminoácidos neutros, por exemplo, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano, e metionina (ver, por exemplo, MacLennan *et al.* 1998, *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67; Sasaki *et al.* 1998, *Adv. Biophys.* 35:1-24).

Tabela 1

| Resíduos Originais | Substituições Exemplares | Substituições Típicas |
|--------------------|---|-----------------------|
| Ala (A) | Vai, Leu, lle | Val |
| Arg (R) | Lys, Gln, Asn | Lys, |
| Asn (N) | Gln | Gln |
| Asp (D) | Glu | Glu |
| Cys (C) | Ser, Ala | Ser |
| Gln (Q) | Asn | Asn |
| Gly (G) | Pro, Ala | Ala |
| His (H) | Asn, Gln, Lys, Arg | Arg |
| lle (I) | Leu, Vai, Met, Ala, Phe, Norleucina | Leu |
| Leu (L) | Norleucina, lle, Val, Met, Ala, | lle |
| Lys (K) | Arg, Ácido 1,4-diamino-butírco, Gln, Asn | Arg |
| Met (M) | Leu, Phe, lle | Leu |
| Phe (F) | Leu, Val, lle, Ala, Tyr | Leu |
| Pro (P) | Ala | Gly |

| | | |
|---------|---|-----|
| Ser (S) | Thr, Ala, Cys | Thr |
| Thr (T) | Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr, Phe | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp, Phe, Thr, Ser | Phe |
| Val (V) | Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina | Leu |

2. Moléculas Biologicamente Ativas

Nas formas de realização da presente invenção a molécula biologicamente ativa é um fator de coagulação. No entanto, a presente divulgação de modo mais geral contempla o uso de qualquer molécula biologicamente ativa tal como a molécula terapêutica da presente divulgação. A molécula biologicamente ativa pode ser um aminoácido simples. A molécula biologicamente ativa pode incluir um polipeptídeo modificado.

A molécula biologicamente ativa pode incluir uma molécula de lipídeo (por exemplo, um esteroide ou colesterol, um ácido graxo, um triacilglicerol, glicero fosfolipídeo, ou esfingolipídeo). A molécula biologicamente ativa pode incluir uma molécula de açúcar (por exemplo, glicose, sucrose, manose). A molécula biologicamente ativa pode incluir uma molécula de ácido nucleico (por exemplo, ADN, ARN). A molécula biologicamente ativa pode incluir uma molécula orgânica pequena ou uma molécula inorgânica pequena.

a. Citocinas e Fatores de Crescimento

Numa modalidade, a molécula biologicamente ativa é um fator de crescimento, ou citocina ou seu análogo ou fragmento. A

molécula biologicamente ativa pode ser qualquer agente capaz de induzir crescimento e proliferação de célula. Numa modalidade específica, a molécula biologicamente ativa é qualquer agente que possa induzir proliferação de eritrócitos. Assim, um exemplo de uma molécula biologicamente ativa contemplado pela invenção é EPO. A molécula biologicamente ativa também pode incluir, mas não está limitado a, RANTES, MIP1 α , MIP1 β , IL-2, IL-3, GM-CSF, hormónio de crescimento, fator de necrose de tumor (por exemplo, TNF α ou β).

A molécula biologicamente ativa pode incluir interferon α , se produzido sinteticamente ou recombinantemente, incluindo mas não limitado a, qualquer um dos cerca de vinte e cinco subtipos estruturalmente relacionados, como, por exemplo, interferon- α 2a, agora comercialmente disponível para uso clínico (ROFERONTM, Roche) e interferon- α 2b também aprovado para uso clínico (INTRONTM, Schering) assim como versões geneticamente engenheiradas de vários subtipos, incluindo, mas não limitado a, interferon α consenso comercialmente disponível (INFERGENTM, Intermune, desenvolvido por Amgen) e interferon de leucócito humano consenso ver, por exemplo, patentes US N°s 4,695,623; 4,897,471, interferon α , fator de crescimento de epiderme, hormónio de liberação de gonadotropina (GnRH), leuprolide, hormónio de estimulação de folículo, progesterona, estrogênio, ou testosterona.

Uma lista de citocinas e fatores de crescimento que podem ser usados na proteína químérica da invenção foi anteriormente descrita (ver, por exemplo, patentes US N°s 6 086 875, 6 485 726, 6 030 613; WO 03/077834; US2003-0235536A1).

b. Agentes Antivirais

Numa modalidade, a molécula biologicamente ativa é um agente antiviral, incluindo seus fragmentos e análogos. Um agente antiviral pode incluir qualquer molécula que inibe ou previne replicação viral, ou inibe ou previne entrada viral Numa célula, ou inibe ou previne egresso viral a partir de uma célula. Numa modalidade, o agente antiviral é um inibidor de fusão. Numa modalidade, o agente antiviral é uma citocina que inibe replicação viral numa outra modalidade, o agente antiviral é interferon α .

O inibidor de fusão viral para uso na proteína quimérica pode ser qualquer molécula que diminua ou previna penetração viral de uma membrana celular de uma célula alvo.

O inibidor de fusão viral pode ser qualquer molécula que diminua ou previna a formação de sincícios entre pelo menos duas células suscetíveis. O inibidor de fusão viral pode ser qualquer molécula que diminua ou previna a ligação de uma membrana bicamada de lipídeo de uma célula eucariótica e uma bicamada de lipídeo de um vírus envelopado. Exemplos de vírus envelopados incluem, mas não são limitados a VIH-1, VIH-2, SIV, influenza, parainfluenza, vírus de Epstein-Barr, CMV, herpes simplex 1, herpes simplex 2 e vírus sincício respiratório.

O inibidor de fusão viral pode ser qualquer que diminua ou previna fusão viral incluindo, mas não limitado a, um polipeptídeo, uma molécula orgânica pequena, ou uma molécula inorgânica pequena. Numa modalidade, o inibidor de fusão é um polipeptídeo. Numa modalidade, o inibidor de fusão viral é um polipeptídeo de 3-36 aminoácidos. Numa modalidade, 10 o inibidor de fusão viral é um polipeptídeo de 3-50 aminoácidos, 10-65 aminoácidos, 10-75 aminoácidos.

O polipeptídeo pode ser compreendido por uma sequência de aminoácidos ocorrendo naturalmente (por exemplo, um fragmento de gp41) incluindo seus análogos e mutantes ou o polipeptídeo pode ser compreendido por uma sequência de aminoácidos não encontrada na natureza, tanto quanto o polipeptídeo exiba atividade inibidora de fusão viral.

Numa modalidade, o inibidor de fusão viral é um polipeptídeo, identificado como sendo um inibidor de fusão viral usando pelo menos um algoritmo de computador, por exemplo, ALLMOT15, 107x178x4 e PLZIP (ver, por exemplo, patentes US 6 013 263; 6 015 881; 6017 536; 6 020 459; 6 060 065; 6 068 973; 6 093 799; e 6 228 983).

Numa modalidade, o inibidor de fusão viral é um inibidor de fusão de VIH. Numa modalidade, VIH é VIH-1. Numa outra modalidade, VIH é VIH-2. Numa modalidade, o inibidor de fusão de VIH é um polipeptídeo compreendido por um fragmento da proteína envelope gp41 de VIH-1. O inibidor de fusão de VIH pode compreender, por exemplo, T20 (SEQ ID N°: 1) ou um seu análogo, T21 (SEQ ID N°: 2) ou um seu análogo, T1249 (SEQ ID N°: 3) ou um seu análogo, NccGgp41 (Louis et al. 2001, J. Biol. Chem. 276: (31)29485 ou um seu análogo, ou 5 hélice (Root et al. 2001, Science 291 :884) ou um seu análogo.

Ensaios conhecidos na técnica podem ser usados para testar atividade de inibição de fusão viral de um polipeptídeo, uma molécula orgânica pequena, ou uma molécula inorgânica pequena. Estes ensaios incluem um ensaio de transcriptase reversa, um ensaio p24, ou ensaio de formação de sincício (ver, por exemplo, patente US 5 464 933).

Uma lista de agentes antivirais que podem ser usados na proteína quimérica da invenção foi anteriormente descrita (ver, por exemplo, patentes US N°s 6,086,875, 6,485,726, 6,030,613; WO 03/077834; US20030235536A1).

c. Agentes Hemostáticos

Numa modalidade, a molécula biologicamente ativa é um fator de coagulação ou outro agente que promove hemostase, incluindo seus fragmentos e análogos. O fator de coagulação pode incluir qualquer molécula que tenha atividade coagulante ou ative uma molécula com atividade coagulante. O fator de coagulação pode ser compreendido por um polipeptídeo. O fator de coagulação pode ser, como um exemplo, mas não limitado a Fator VIII, Fator IX, Fator XI, Fator XII, fibrinogénio, protrombina, Fator V, Fator VII, Fator X, Fator XIII ou fator de Willebrand. Numa modalidade, o fator de coagulação é Fator VII ou Fator Vila. O fator de coagulação pode ser um fator que participa no caminho extrínseco. O fator de crescimento pode ser um fator que participa no caminho intrínseco. Alternativamente, o fator de coagulação pode ser um fator que participa em ambos caminhos extrínseco e intrínseco.

O fator de coagulação pode ser um fator de coagulação humano ou um fator de coagulação não-humano, por exemplo, derivado de um primata não-humano, um porco ou qualquer mamífero. O fator de coagulação pode ser fator de coagulação quimérico, por exemplo, o fator de coagulação pode compreender uma porção de um fator de coagulação humano e uma porção de um fator de coagulação suíno ou uma porção de um primeiro fator de coagulação não-humano e uma porção de um segundo fator de coagulação não-humano.

O fator de coagulação pode ser um fator de coagulação ativado. Alternativamente, o fator de coagulação pode ser uma forma inativa de um fator de coagulação, por exemplo, um zimogénio. O fator de coagulação inativo pode sofrer ativação subsequente a ser ligado a pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina. O fator de coagulação inativo pode ser ativado subsequente a administração a um sujeito. Alternativamente, o fator de coagulação inativo pode ser ativado antes de administração.

Em certas modalidades uma endopeptidase, por exemplo, enzima clivando aminoácido básico emparelhado (PACE), ou qualquer membro de família PACE, tal como PCSK1-9, incluindo suas versões truncadas, ou seu equivalente levedura Kex2 de *S. cerevisiae* e versões truncadas de Kex2 (Kex2 1-675) (ver, por exemplo, patente US N°s 5 077 204; 5 162 220; 10 5 234 830; 5 885 821; 6 329 176) pode ser usada para clivar um pró-peptídeo para formar a proteína quimérica madura da invenção (por exemplo, fator VII, fator IX).

d. Outras Moléculas Proteináceas Biologicamente Ativas

Numa modalidade, a molécula biologicamente ativa é um receptor ou um seu fragmento ou análogo. O receptor pode ser expresso sobre uma superfície de célula, ou alternativamente o receptor pode ser expresso no interior da célula. O receptor pode ser um receptor viral, por exemplo, CD4, CCR5, CXCR4, CD21, CD46. A molécula biologicamente ativa pode ser um receptor bacterial. A molécula biologicamente ativa pode ser uma proteína matriz extra celular ou um seu fragmento ou análogo, importante em colonização e infecção bacterial (ver, por exemplo, patentes US N°s 5 648 240; 5 189 015; 5 175 096) ou uma

proteína de superfície bacterial importante em adesão e infecção (ver, por exemplo, patente US 5 648 240). A molécula biologicamente ativa pode ser um fator de crescimento, hormónio ou receptor de citocina, ou um seu fragmento ou análogo, por exemplo, receptor de TNF α , o receptor de eritropoietina, CD25, CD122 ou CD132.

Uma lista de outras moléculas protéicas que podem ser usadas na proteína químérica da invenção foi previamente descrita (ver, por exemplo, patentes US N°s 6,086,875; 6,485,726; 6,030,613; WO 03/077834; 30 US2003-0235536A1).

e. Ácidos Nucleicos

Numa modalidade, a molécula biologicamente ativa é um ácido nucleico, por exemplo, ADN, ARN. Numa modalidade específica, a molécula biologicamente ativa é um ácido nucleico que pode ser usado em interferência ARN (ARNi). A molécula de ácido nucleico pode ser como um exemplo, mas não como uma limitação, uma molécula anti-sentido ou uma ribozima ou um aptamero.

Moléculas de ADN e ARN anti-sentido atuam para diretamente bloquear a tradução de ARNm através de hibridização para ARNm alvejado e prevenção de tradução de proteína. Abordagens anti-sentido envolvem o desenho de oligonucleotídeos que são complementares a um ARNm gene alvo. Os oligonucleotídeos anti-sentido ligarão aos transcritos de ARNm gene alvo complementares e prevenirão tradução. Complementaridade absoluta não é requerida.

Uma sequência “complementar” a uma porção de ARN, como aqui referida, significa uma sequência tendo suficiente complementaridade para ser capaz de hibridizar com o ARN,

formando um duplex estável; no caso de ácidos nucleicos anti-sentido de fita dupla, uma fita simples do ADN duplex pode assim ser testada, ou formação triplex pode ser ensaiada. A habilidade para hibridizar dependerá de ambos, o grau de complementaridade e o comprimento do ácido nucleico anti-sentido. Geralmente, quanto mais longo o ácido nucleico hibridizando, mais desemparelhamento de base com um ARRN ele pode conter e ainda formar um duplex estável (ou triplex, como pode ser o caso). Aqueles versados na técnica podem determinar um grau tolerável de desemparelhamento através do uso de procedimentos padrões para determinar o ponto de fusão do complexo hibridizado.

Ácidos nucleicos anti-sentido devem ser de pelo menos seis nucleotídeos em comprimento, e são preferivelmente oligonucleotídeos variando de 6 a cerca de 50 nucleotídeos em comprimento. Em aspectos específicos, o oligonucleotídeo é pelo menos de 10 nucleotídeos, pelo menos 17 nucleotídeos, pelo menos 25 nucleotídeos ou pelo menos 50 nucleotídeos.

Os oligonucleotídeos podem ser ADN ou ARN ou misturas químéricas ou suas versões derivadas ou modificadas, de fita simples ou fita dupla. O oligonucleotídeo pode ser modificado na metade base, metade açúcar, ou cadeia principal fosfato, para aperfeiçoar estabilidade da molécula, hibridização, etc. O oligonucleotídeo pode incluir outros grupos apostos, tais como polipeptídeos (por exemplo, para alvejar receptores de célula hospedeira *in vivo*), ou agentes facilitando transporte através de membrana de célula (ver, por exemplo, Letsinger *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553; Lemaitre *et al.* 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648; WO 88/09810) ou a barreira de sangue - cérebro (ver, por exemplo, WO

89/10134), agentes de clivagem disparado - hibridização (ver, por exemplo, Krol *et al.* 1988, BioTechniques 6:958) ou agentes intercalantes (ver, por exemplo, Zon 1988, Pharm. Res. 5:539). Para este fim, o oligonucleotídeo pode ser conjugado a uma outra molécula, por exemplo, um polipeptídeo, agentes de reticulação disparado com hibridização, agente de transporte, ou agente de clivagem disparado por hibridização.

Moléculas ribozimas designadas para clivagem catalítica de transcritos de ARNm gene alvos também podem ser usadas para prevenirem tradução de ARNm gene alvo e, por isso, expressão de produto gene alvo. (Ver, por exemplo, WO 90/11364; Sarver *et al.* 1990, Science 247, 1222-1225).

Ribozimas são moléculas de ARN enzimáticas capazes de catalisarem a específica clivagem de ARN. (Ver Rossi 1994, Current Biology 4:469). O mecanismo de ação de ribozima envolve hibridização específica de sequência da molécula de ribozima para ARN alvo complementar, seguida por um evento de clivagem endonucleolítica. A composição de moléculas ribozima tem de incluir uma ou mais sequências complementares ao ARNm gene alvo, e tem de incluir a bem conhecida sequência catalítica responsável por clivagem de ARNm. Para esta sequência, ver, por exemplo, patente US 5 093 246.

Numa modalidade, ribozimas que clivam ARNm em sequências de reconhecimento específicas de sítio podem ser usadas para destruição de ARNm's gene alvo. Numa outra modalidade, o uso de ribozimas cabeça de martelo é contemplado. Ribozimas cabeça de martelo clivam ARNm's em localizações ditadas por regiões de flanco que formam pares de 34 bases complementares com o ARNm alvo. O único requisito é que o

ARNm alvo tenha a seguinte sequência de duas bases: 5'-UG-3'. O constructo e produção de ribozimas cabeça de martelo são bem conhecidos na técnica e são mais inteiramente descritas em Myers 1995, Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, New York, e em Haseloff and Gerlach 1988, Nature, 334:585.

f. Moléculas pequenas

A presente divulgação também contempla o uso de qualquer molécula pequena terapêutica ou droga como a molécula biologicamente ativa na proteína quimérica da invenção. Uma lista de moléculas pequenas e drogas que podem ser usadas na proteína quimérica da invenção foi anteriormente descrita (ver, por exemplo, patentes US N°s 6 086 875; 6 485 726; 6 030 613; WO 03/077834; US2003-0235536A1).

2. Imunoglobulinas

As proteínas quiméricas da invenção compreendem pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina. Imunoglobulinas são compreendidas por quatro cadeias de proteínas que associam-se covalentemente duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Cada cadeia é ainda compreendida por uma região variável e uma região constante. Dependendo do isótopo de imunoglobulina, a região constante de cadeia pesada é compreendida por 3 ou 4 domínios de região constante (por exemplo, CH1, CH2, CH3, CH4). Alguns isótopos ainda são compreendidos por uma região de gongo.

A porção de uma região constante de imunoglobulina pode ser obtida a partir de qualquer mamífero. A porção de uma região constante de imunoglobulina pode incluir uma porção

de uma região constante de imunoglobulina humana, uma região constante de imunoglobulina de primata não humano, uma região constante de imunoglobulina bovina, uma região constante de imunoglobulina suína, uma região constante de imunoglobulina murina, uma região constante de imunoglobulina ovina ou uma região constante de imunoglobulina de rato.

A porção de uma região constante de imunoglobulina pode ser produzida de modo recombinante ou sinteticamente. A imunoglobulina pode ser isolada a partir de uma biblioteca de ADNc. A porção de uma região constante de imunoglobulina pode ser isolada a partir de uma biblioteca de fago (Ver, por exemplo, McCafferty *et al.*, 1990, *Nature* 348:552, Kang *et al.* 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363; EP 0 589 877 B1). A porção de uma região constante de imunoglobulina pode ser obtida por lançamento de gene de sequências conhecidas (Mark *et al.* 1992, *Bio/Technol.* 10:779). A porção de uma região constante de imunoglobulina pode ser isolada através de recombinação *in vivo* (Waterhouse *et al.* 1993, *Nucl. Acid Res.* 21:2265). A imunoglobulina pode ser uma imunoglobulina humanizada (patente US N° 5 585089, Jones *et al.* 1986, *Nature* 332:323).

A porção de uma região constante de imunoglobulina pode incluir uma porção de uma IgG, uma IgA, uma IgM, uma IgO, ou uma IgE. Numa modalidade, a imunoglobulina Numa IgG. Numa outra modalidade, a imunoglobulina é IgG1. Numa outra modalidade, a imunoglobulina é IgG2.

A porção de uma região constante de imunoglobulina pode incluir a inteira região constante de cadeia pesada, ou um seu fragmento ou análogo. Numa modalidade, uma região constante de cadeia pesada pode compreender um domínio CH1,

um domínio CH2, um domínio CH3, e/ou uma região gônzo. Numa outra modalidade, uma região constante de cadeia pesada pode compreender um domínio CH1, um domínio CH2, um domínio CH3, e/ou um domínio CH4.

A porção de uma região constante de imunoglobulina pode incluir um fragmento Fc. Um fragmento Fc pode ser compreendido pelos domínios CH2 e CH3 de uma imunoglobulina e a região gônzo da imunoglobulina. O fragmento Fc pode ser o fragmento Fc de uma IgG1, IgG2, uma IgG3 ou uma IgG4. Numa modalidade específica, a porção de uma região constante de imunoglobulina é um fragmento Fc de uma IgG1. Numa outra modalidade, a porção de uma região constante de imunoglobulina é um fragmento Fc de uma IgG2.

Com base na divulgação providenciada acima e na divulgação contida aqui, as proteínas quiméricas da presente invenção compreendem pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina. Contudo, é também uma exigência que estas proteínas quiméricas da presente invenção, a porção da região constante de imunoglobulina sejam um parceiro de ligação de receptor neonatal Fc (FcRn). Um parceiro de ligação de FcRn é qualquer molécula que pode ser especificamente ligada pelo receptor de FcRn com consequente transporte ativo pelo receptor de FcRn do parceiro de ligação de FcRn. Especificamente ligado refere-se a duas moléculas formando um complexo que é relativamente estável sob condições fisiológicas. Ligação específica é caracterizada por uma alta afinidade e uma capacidade baixa a moderada como distinguida de ligação não-específica que usualmente tNuma baixa afinidade com uma capacidade alta a moderada. Tipicamente, ligação é considerada específica quando a constante de afinidade K_A é maior que $10^6 M^{-1}$, ou mais preferivelmente maior que $10^8 M^{-1}$.

Se necessário, a ligação não-específica pode ser reduzida sem afetar substancialmente ligação específica através de variação de condições de ligação. As apropriadas condições de ligação como concentração das moléculas, resistência iônica da solução, temperatura, tempo permitido para ligação, concentração de um agente de bloqueio (por exemplo, albumina de soro, caseína de leite), etc., podem ser otimizadas por aqueles versados na técnica usando técnicas rotineiras.

O receptor de FcRn foi isolado de várias espécies mamíferas incluindo humanos. As sequências de FcRn humano, FcRn de macaco, FcRn de rato e FcRn de camundongo são conhecidas (Story *et al.* 1994, *J. Exp. Med.* 180:2377). O receptor de FcRn liga IgG (mas não outras classes de imunoglobulinas como IgA, IgM, IgD, e IgE) em pH relativamente baixo, transportaativamente a IgG transcelularmente numa direção luminal para serosal, e então libera a IgG em pH relativamente maior encontrado nos fluidos intersticiais. Ele é expresso em tecido epitelial adulto (patentes US N°s 6 485 726, 6 030 613, 6 086 875; WO 03/077834; US2003-0235536A1) incluindo pulmão e epitélio intestinal (Israel *et al.* 1997, *Immunology* 92:69) epitélio tubular proximal renal (Kobayashi *et al.* 2002, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:F358) assim como epitélio nasal, superfícies vaginais, e superfícies de árvore biliar.

Parceiros de ligação de FcRn da presente invenção encampam qualquer molécula que pode ser especificamente ligada pelo receptor FcRn, incluindo IgG integral, o fragmento Fc de IgG, e outros fragmentos que incluem a completa região ligante do receptor FcRn. A região da porção Fc de IgG que liga-se ao receptor FcRn foi descrita baseada em cristalografia de raios X (Burmeister *et al.* 1994, *Nature*

372:379). A principal área de contato do Fc com o FcRn está próxima da junção dos domínios CH2 e CH3. Contatos Fc-FcRn encontram-se todos dentro uma cadeia pesada Ig simples. Os parceiros de ligação de FcRn incluem IgG integral, o fragmento Fc de IgG, e outros fragmentos de IgG que incluem a completa região ligante de FcRn. Os principais sítios de contato incluem resíduos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, e 314 do domínio CH2 e resíduos de aminoácidos 385-387, 428, e 433-436 do domínio CH3. Referências feitas a numeração de aminoácidos de imunoglobulinas ou fragmentos de imunoglobulinas, ou regiões, são todas baseadas em Kabat *et al.* 1991, sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, MD.

A região Fc de IgG pode ser modificada de acordo com procedimentos bem reconhecidos como mutagénese direcionada sítio e semelhantes para render IgG modificada ou fragmentos Fc ou suas porções que serão ligados por FcRn. Tais modificações incluem modificações remotas a partir dos sítios de contato de FcRn assim como modificações dentro de sítios de contato que preservam ou mesmo aperfeiçoam ligação ao FcRn. Por exemplo, os seguintes resíduos de aminoácidos simples em IgG1 Fc(Fcyl) podem ser substituídos sem significante perda de afinidade Ligante de Fc para FcRn:

: P238A, 5239A, K246A, K248A, 0249A, M252A, T256A, E258A, T260A, 25 D265A, 5267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, 5298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, 5324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, 5337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A,

T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, 5375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, 5383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, e K447A, onde por exemplo, P238A representa prolina tipo selvagem substituída por alanina na posição número 238. Como um exemplo, uma modalidade específica, incorpora a mutação N297A, removendo um sítio de N-glicosilação altamente conservado. Em adição a alanina outros aminoácidos podem ser substitutos dos aminoácidos do tipo selvagem nas posições especificadas acima. Mutações podem ser introduzidas simplesmente em Fc dando origem a mais de cem parceiros de ligação de FcRn distintos a partir de Fc nativo. Adicionalmente, combinações de duas, três ou mais destas mutações individuais podem ser introduzidas juntas, originando mais centenas de parceiros de ligação de FcRn. Além disso, um dos parceiros de ligação de FcRn do híbrido monômero-dímero pode sofrer mutação e o outro parceiro de ligação de FcRn não sofrer mutação, ou ambos podem sofrer mutação mas com mutações diferentes. Qualquer uma das mutações aqui descritas, incluindo N297A, pode ser usada para modificar Fc, independente da molécula biologicamente ativa (por exemplo, EPO, IFN, Fator IX, T20).

Certas mutações acima podem conferir nova funcionalidade sobre o parceiro de ligação de FcRn. Por exemplo, uma modalidade incorpora N297A, removendo um sítio de N-glicosilação altamente conservado. O efeito desta mutação é reduzir imunogenicidade, pelo que aperfeiçoando meia vida circulante do parceiro de ligação de FcRn, e tornar o parceiro de ligação de FcRn incapaz de ligação a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, e FcγRIIIA, sem comprometer afinidade por FcRn (Routledge *et al.* 1995, *Transplantation* 60:847; Friend

et al. 1999, *Transplantation* 68:1632; Shields et al. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591). Ainda como um exemplo de nova funcionalidade surgindo de mutações descritas acima afinidade para FcRn pode ser aumentada além daquela de tipo selvagem em alguns exemplos. Esta afinidade aumentada pode refletir uma aumentada taxa "on", uma diminuída taxa "off" ou ambas, uma aumentada taxa "on" e uma diminuída taxa "off". Mutações acreditadas proporcionam uma afinidade aumentada para FcRn incluindo T256A, T307A, E380A, e N434A (Shields et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591).

Adicionalmente, pelo menos três receptores gama Fc humanos parecem reconhecer um sítio de ligação sobre IgG dentro de região gonzo inferior, geralmente aminoácidos 234-237. Por isso, um outro exemplo de nova funcionalidade e potencial imunogenicidade diminuída pode surgir de mutações desta região, como por exemplo, através de substituição de aminoácidos 233-236 de IgG1 humana "ELLG" para a correspondente sequência de IgG2 "PVA" (com uma supressão de aminoácido). Foi mostrado que FcγRI, FcγRII, e FcγRIII, que mediam várias funções efetoras não se ligarão a IgG1 quando tais mutações foram introduzidas. Ward and Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 e Armour et al. 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613.

Numa modalidade, o parceiro de ligação de FcRn é um polipeptídeo incluindo a sequência PKNSSMISNTP (SEQ ID N°: 26) e ainda opcionalmente incluindo uma sequência selecionada de HQSLGTQ (SEQ ID N°: 27), HQNLSOGK (SEQ ID N°: 28), HQNISOGK (SEQ ID N°: 29), ou VISSH LGQ (SEQ ID N°: 30) (patente US N° 5,739,277).

Dois receptores FcRn podem ligar-se a uma simples molécula Fc. Dados cristalográficos sugerem que cada molécula FcRn

se liga a um simples peptídeo do homodímero Fc. Numa modalidade, ligação do parceiro de ligação FcRn, por exemplo, um fragmento Fc de uma IgG, a uma molécula biologicamente ativa provê um meio de liberação de molécula biologicamente ativa oralmente, bucalmente, sublingualmente, retalmente, vaginalmente, como um aerossol administrado nasalmente ou via uma via pulmonar, ou via uma via ocular. Numa outra modalidade, a proteína quimérica pode ser administrada invasivamente, por exemplo, subcutaneamente, intravenosamente.

O técnico versado entenderá que porções de uma região constante de imunoglobulina para uso na proteína quimérica da invenção podem incluir mutantes ou seus análogos, ou podem incluir regiões constantes de imunoglobulina modificadas quimicamente (por exemplo, pegiladas), ou seus fragmentos (ver, por exemplo, Aslam and Dent 1998, *Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences* Macmillan Reference, London). Em um exemplo, um mutante pode prover aperfeiçoada ligação de um parceiro de ligação de FcRn para o FcRn. Também contemplados para uso na proteína quimérica da invenção são miméticos de peptídeos de pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, por exemplo, um mimético peptídeo de um fragmento Fc ou um mimético peptídeo de um parceiro de ligação de FcRn. Numa modalidade, o mimético peptídeo é identificado usando mostrador fago ou via seleção de biblioteca química (ver, por exemplo, McCafferty et al. 1990, *Nature* 348:552, Kang et al. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363; EP 0589 877 B1).

3. Ligantes Opcionais

A proteína quimérica da invenção opcionalmente pode compreender pelo menos uma molécula ligadora. O Ligante pode ser compreendido por qualquer molécula orgânica. Numa modalidade, o Ligante é polietileno glicol (PEG). Numa outra modalidade, o Ligante é compreendido por aminoácidos. O Ligante pode compreender 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos. Numa modalidade, o Ligante é o ligante de oito aminoácidos EFA-GAAAV (SEQ ID N°: 31). Qualquer um dos ligantes aqui descritos pode ser usado na proteína quimérica da invenção, por exemplo, um híbrido monômero-dímero, incluindo EFAGAAAV, independente da molécula biologicamente ativa (por exemplo, EPO, IFN, Fator IX).

O Ligante pode compreender a sequência G_n . O Ligante pode compreender a sequência $(GA)_n$ (SEQ ID N°: 32). O Ligante pode compreender a sequência $(GGS)_n$ (SEQ ID N°: 33). O ligante pode compreender a sequência $(GGS)_n(GGGGS)_n$ (SEQ ID N°: 34). Nestes exemplos, n pode ser um inteiro de 1-10, isto é, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Exemplos de ligantes incluem, mas não são limitados a, GGG (SEQ ID N°: 35), SGGSGGGS (SEQ ID N°: 36), GGSGGSGGSGGS (SEQ ID N°: 37), GGSGGGGGGGSGGG (SEQ ID N°: 38), GGSGGGGGGGGGGG (SEQ ID N°: 39). O ligante não elimina ou diminui a atividade biológica da proteína quimérica. Opcionalmente, o Ligante aperfeiçoa a atividade biológica da proteína quimérica, por exemplo, através de ainda diminuição de efeitos de impedimento estéreo e tomando a molécula biologicamente ativa mais acessível para seu sítio de ligação alvo.

Numa modalidade específica, o ligante para interferon α é de 15-25 aminoácidos de comprimento. Numa outra modalidade específica, o ligante para interferon α é de 15-20

aminoácidos de comprimento. Numa outra modalidade específica, o ligante para interferon α é de 10-25 aminoácidos de comprimento. Numa outra modalidade específica, o ligante para interferon α é de 15 aminoácidos de comprimento. Numa modalidade, o ligante para interferon α é (GGGGS)_n (SEQ ID N°: 40) onde G representa glicina, S representa serina e n é um inteiro de 1-10. Numa modalidade específica, n é 3.

O ligante também pode incorporar uma metade capaz de ser activada tanto quimicamente (por exemplo, hidrólise de uma ligação éster), enzimaticamente (isto é, incorporação de uma sequência de clivagem protease) ou fotoliticamente (por exemplo, um cromóforo, tal como ácido 3-amino3-(2-nitrofenil) propiónico (ANP» de modo a liberar a molécula biologicamente ativa da proteína Fc.

4. Dimerização de Proteína Quimérica Usando Parceiros de Ligação Específicos

Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção comprehende uma primeira cadeia de polipeptídeo compreendendo pelo menos um primeiro domínio, do dito primeiro domínio tendo pelo menos um parceiro de ligação específico, e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreendendo pelo menos um segundo domínio, onde o dito segundo domínio, é um parceiro de ligação específico do dito primeiro domínio. A proteína quimérica assim comprehende um polipeptídeo capaz de dimerizar com um outro polipeptídeo devido à interação do primeiro domínio e o segundo domínio. Processos de dimerização de anticorpos usando domínios heterólogos são conhecidos na técnica (ver patentes US N°s 5,807,706, e 5,910,573; Kostelny et al. 1992, J. Immunol. 148(5):1547).

Dimerização pode ocorrer através de formação de uma ligação covalente, ou alternativamente uma ligação não-covalente, por exemplo, interação hidrofóbica, forças de Van der Waal's, interdigitação de peptídeos anfifílicos tais como, mas não limitado a, hélices α , interações carga - carga de aminoácidos transportando cargas opostas, tais como, mas não limitado a, lisina e ácido aspártico, arginina e ácido glutâmico. Numa modalidade, o domínio é um feixe de hélice compreendendo uma hélice, uma volta e uma outra hélice. Numa outra modalidade, o domínio é um zíper leucina compreendendo um peptídeo tendo vários aminoácidos de repetição onde cada sétimo aminoácido é um resíduo leucina. Numa modalidade, os parceiros de ligação específicos são fos/jun. (ver Branden et al. 1991, *Introduction To Protein Struture*, Garland Publishing, New York).

Numa outra modalidade, ligação é mediada por uma ligação química (ver, por exemplo, Brennan et al. 1985, *Science* 229:81). Nesta modalidade, imunoglobulinas intactas, ou proteínas quiméricas compreendidas por pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina são clivadas para gerarem fragmentos de cadeia pesada. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante ditiolarsenito de sódio para estabilizar ditióis vicinais e prevenir formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos gerados são então convertidos a derivados tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados TNB é então reconvertido ao fragmento de cadeia pesada tioI por redução com mercapto etilamina e é então misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado TNB para formar um dímero químérico.

D. Ácidos Nucleicos

A invenção refere-se a um primeiro constructo de ácido nucleico e um segundo constructo de ácido nucleico cada uma compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma porção da proteína quimérica da invenção. Numa modalidade, o primeiro constructo de ácido nucleico compreende uma sequência de ácido nucleico codificando uma porção de uma região constante de imunoglobulina ligada operativamente a uma segunda sequência de ADN codificando uma molécula biologicamente ativa, e o dito segundo constructo de ADN compreende uma sequência de ADN codificando uma região constante de imunoglobulina sem a segunda sequência de ADN codificando uma molécula biologicamente ativa.

A molécula biologicamente ativa pode incluir, por exemplo, mas não como uma limitação, um inibidor de fusão viral, um fator de coagulação, um fator de crescimento ou hormónio, ou um receptor, ou análogo, ou fragmento de qualquer dos precedentes. As sequências de ácidos nucleicos também podem incluir adicionais sequências ou elementos conhecidos na técnica (por exemplo, promotores, aperfeiçoadores, sequências poli A, marcadores de afinidade). Numa modalidade, a sequência de ácidos nucleicos do segundo constructo opcionalmente pode incluir uma sequência de ácidos nucleicos codificando um Ligante colocado entre a sequência de ácidos nucleicos codificando a molécula biologicamente ativa e a porção da região constante de imunoglobulina. A sequência de ácidos nucleicos do segundo constructo de ADN opcionalmente pode incluir uma sequência ligadora colocada antes ou após a sequência de ácidos nucleicos codificando a molécula biologicamente ativa e/ou a porção da região constante de imunoglobulina.

Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico é compreendido por ADN. Numa outra modalidade, o constructo de ácido nucleico compreendido por ARN. O constructo de ácido nucleico pode ser um vetor, por exemplo, um vetor viral ou um plasmídeo. Exemplos de vetores virais incluem, mas não são limitados a, vetor adenovírus, um vetor vírus associado adeno, ou um vetor vírus de leucemia murino. Exemplos de plasmídeos incluem, mas não são limitados a, pUC, pGEM e pGEX.

Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 3a (SEQ ID N°: 7). Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 3b (SEQ ID N°: 9). Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 3c (SEQ ID N°: 11). Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 3d (SEQ ID N°: 13). Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 3e (SEQ ID N°: 15). Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 3f (SEQ ID N°: 17). Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 3g (SEQ ID N°: 19). Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 3h (SEQ ID N°: 21). Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 3i (SEQ ID N°: 23). Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 3j (SEQ ID N°: 25). Numa modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de figura 17a (SEQ ID N°: 27).

Devido à conhecida degenerescência do código genético, onde mais de um códon pode codificar o mesmo aminoácido, uma sequência de ADN pode variar daquela mostrada em SEQ ID N°s: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 ou 27 e ainda codificar um polipeptídeo tendo a correspondente sequência de aminoácidos de SEQ ID N°s: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ou 26, respectivamente. Tais sequências de ADN variantes podem resultar de mutações silenciosas (por exemplo, ocorrendo durante amplificação PCR), ou podem ser o produto de mutagénese deliberada de uma sequência nativa. A invenção assim provê sequências de ADN isoladas codificando polipeptídeos da invenção, escolhidos de: (a) ADN compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID N°s: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 ou 27; (b) ADN codificando os polipeptídeos de SEQ ID N°s: 6, 8, 10, 12, 25, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ou 26; (c) ADN capaz de hibridização a um ADN de (a) ou (b) sob condições de rigorosidade moderada e que codifica polipeptídeos da invenção; (d) ADN capaz de hibridização a um ADN de (a) ou (b) sob condições de alta rigorosidade e que codifica polipeptídeos da invenção, e (e) ADN que é degenerado como um resultado do código genético a um ADN definido em (a), (b), (c), ou (d) e que codifica polipeptídeos da invenção. É claro, polipeptídeos codificados por tais sequências de ADN são abrangidos pela presente divulgação.

Numa outra modalidade, as moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência codificando a proteína químérica da invenção também podem compreender sequências de nucleotídeos que são pelo menos 80% idênticas a uma sequência nativa. São também contempladas modalidades nas quais moléculas de ácidos nucleicos compreendendo uma sequência codificando a proteína químérica da invenção compreendem uma sequência que é pelo menos 90% idêntica,

pelo menos 95% idêntica, pelo menos 98% idêntica, pelo menos 99% idêntica, ou pelo menos 99,9% idêntica a uma sequência nativa. Uma sequência nativa pode incluir qualquer sequência de ADN não alterada pela mão humana. A percentagem de identidade pode ser determinada através de inspeção visual e cálculo matemático. Alternativamente, a percentagem de identidade de duas sequências de ácidos nucleicos pode ser determinada através de comparação de informação de sequência usando o programa de computador GAP, versão 6.0 descrito por Devereux *et al.* 1984, Nucl. Acids Res. 12:387, e disponível da University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). Os parâmetros default preferidos para o programa GAP incluem: (1) uma matriz de comparação unária (contendo um valor de 1 para identidades e 0 para não-identidades) para nucleotídeos, e a matriz de comparação pesada de Gribskov and Burgess 1986, Nucl. Acids Res. 14:6745, como descrito por Schwartz and Dayhoff, eds. 1979, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358; (2) uma penalidade de 3,0 para cada folga e uma adicional penalidade de 0,10 para cada símbolo em cada folga; e (3) nenhuma penalidade para folgas de extremidade. Outros programas usados por aqueles versados na técnica de comparação de sequências também podem ser usados. Com base na divulgação acima, e na divulgação aqui contida, a presente invenção providencia primeiros e segundos polinucleotídeos como indicado nas reivindicações anexas.

E. Síntese de Proteínas Químéricas

Proteínas químéricas compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e uma molécula biologicamente ativa podem ser sintetizadas usando-se

técnicas bem conhecidas. Por exemplo, as proteínas químéricas da invenção podem ser sintetizadas de modo recombinante em células (ver, por exemplo, Sambrook et al., 1989, Molecular cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. e Ausubel et al. 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.). Alternativamente, as proteínas químéricas da invenção podem ser sintetizadas usando-se conhecidos processos sintéticos como síntese de fase sólida. Técnicas sintéticas são bem conhecidas (ver, por exemplo, Merrifield, 1973, Chemical Polypeptides (Katsoyannis and Panayotis eds.) pp. 335-61; Merrifield 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Davis et al. 1985, Biochem. Intl. 10:394; Finn et al. 1976, The Proteins (3d ed.) 2:105; Erikson et al. 1976, The Proteins (3d ed.) 2:257; patente US N° 3 941 763. Alternativamente, as proteínas químéricas da invenção podem ser sintetizadas usando uma combinação de processos recombinantes e sintéticos. Em certas aplicações, pode ser benéfico usar um processo recombinante ou uma combinação de processos recombinantes e sintéticos.

Ácidos nucleicos codificando uma molécula biologicamente ativa podem ser facilmente sintetizados usando técnicas recombinantes bem conhecidas. Alternativamente, os próprios peptídeos podem ser quimicamente sintetizados. Ácidos nucleicos da invenção podem ser sintetizados através de processos padrões conhecidos na técnica, por exemplo, através de uso de um sintetizador de ADN automatizado (como disponível comercialmente de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como exemplos, oligonucleotídeos fosforotioatos podem ser sintetizados através do processo de Stein et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16:3209, oligonucleotídeos de fosfonato de metila podem

ser preparados através do uso de suportes de polímero de vidro de poro controlado como descrito em Sarin *et al.* 1988, *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7448. Processos adicionais de síntese de ácidos nucleicos são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, patentes US N°s 6,015,881; 6,281,331; 6,469,136).

Sequências de ADN codificando regiões constantes de imunoglobulina, ou seus fragmentos, podem ser clonadas de uma variedade de bibliotecas genómicas ou ADNC conhecidas na técnica. As técnicas para isolamento de tais sequências de ADN usando processos baseados em sonda são técnicas convencionais e são bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Sondas para isolamento de tais sequências de ADN podem ser baseadas em sequências de ADN publicadas (ver, por exemplo, Hieter *et al.* 1980, *Cell* 22:197-207). O processo de reação de cadeia polimerase (PCR) mostrado por Mullis *et al.* (patente US N° 4 683 195) e Mullis (patente US N° 4 683 202) pode ser usado. A escolha de biblioteca e seleção de sondas para o isolamento de tais sequências de ADN está dentro do nível de conhecimento comum na técnica. Alternativamente, sequências de ADN codificando imunoglobulinas ou seus fragmentos podem ser obtidas a partir de vetores conhecidos na técnica conterem imunoglobulina ou seus fragmentos.

Para produção recombinante, uma primeira sequência de polinucleotídeo codificando uma porção da proteína quimérica da invenção (isto é, uma porção de uma região constante de imunoglobulina) e uma segunda sequência de polinucleotídeo codificando uma porção da proteína quimérica da invenção (por exemplo, uma porção de uma região constante de imunoglobulina e uma molécula biologicamente ativa) são inseridas em apropriados

veículos de expressão, isto é, vetores que contêm os necessários elementos para a transcrição e tradução da sequência codificante inserida, ou no caso de um vetor viral ARN, os elementos necessários para replicação e tradução. Os ácidos nucleicos codificando a proteína quimérica são inseridos no vetor em próprio quadro de leitura.

Os veículos de expressão são então transfectados ou co-transfectados Numa apropriada célula alvo, que expressará os polipeptídeos. Técnicas de transfecção conhecidas incluem, mas não são limitadas a, precipitação com fosfato de cálcio (Wigler et al. 1978, *Cell* 14:725) e eletroporação (Neumann et al. 1982, *EMBO, J.* 1:841), e reagentes baseados em lipossoma. Uma variedade de sistemas de vetor de expressão - hospedeiro pode ser utilizada para expressar as proteínas quiméricas aqui descritas incluindo ambas células procarióticas ou eucarióticas. Estas incluem, mas não são limitadas a, microrganismos como bactérias (por exemplo, *E. co*") transformadas com vetores de expressão de ADN plasmídeo ou ADN de bacteriófago recombinante contendo uma apropriada sequência codificante; levedura ou fungos filamentosos transformados com vetores de expressão de fungos ou levedura recombinantes contendo uma apropriada sequência codificante; sistemas de células de insetos infectadas com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, baculovírus) contendo uma apropriada sequência codificante; sistemas de células de plantas infectadas com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, vírus mosaico de couve-flor ou vírus mosaico de tabaco) ou transformadas com vetores de expressão de plasmídeo recombinante (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo uma apropriada sequência codificante; ou sistemas de célula

animal, incluindo células de mamíferos (por exemplo, células CHO, Cos, HeLa).

Quando a proteína quimérica da invenção é recombinantemente sintetizada Numa célula procariótica pode ser desejável dobrar novamente a proteína quimérica. A proteína quimérica produzida através deste processo pode ser re-dobrada para uma conformação biologicamente ativa usando condições conhecidas na técnica, por exemplo, desnaturação sob condições redutoras e então lentamente dializada em PBS.

Dependendo do sistema de expressão usado, a proteína quimérica expressa é então isolada através de procedimentos bem estabelecidos na técnica (por exemplo, cromatografia de afinidade, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de troca de iões).

Os vetores de expressão podem codificar marcadores que permitam fácil purificação da proteína quimérica produzida recombinantemente. Exemplos incluem, mas não são limitados a vetor pUR278 (Ruther et al. 1983, BEMO J. 2:1791) onde a proteína quimérica aqui descrita codificando sequências pode ser ligada no vetor em estrutura com a região codificante lac Z de modo que uma proteína híbrida é produzida; vetores pGEX podem ser usados para expressarem proteínas quiméricas da invenção com um marcador glutationa S-transferase (GST). Estas proteínas são usualmente solúveis e podem ser facilmente purificadas de células por adsorção a contas de glutationa - agarose seguido por eluição na presença de glutationa livre. Os vetores incluem sítios de clivagem (trombina ou Fator Xa protéase ou PreScission Protease™ (Pharmacia, Peapack, N.J.)) para fácil remoção do marcador após purificação.

Para aumentar eficiência de produção, os polinucleotídeos podem ser designados para codificação de múltiplas unidades da proteína quimérica da invenção separadas por sítios de clivagem enzimática. O resultante polipeptídeo pode ser clivado (por exemplo, através de tratamento com a enzima apropriada) de modo a recuperar as unidades de polipeptídeo. Isto pode aumentar o rendimento de polipeptídeos dirigido por um promotor simples. Quando usado em apropriados sistemas de expressão viral, a tradução de cada polipeptídeo codificado pelo ARNm é direcionada internamente no transcrito; por exemplo, através de um sítio de entrada de ribossoma interno, IRES. Assim, o constructo policistrônico direciona a transcrição de um ARNm policistrônico grande, simples que, por sua vez, direciona a tradução de polipeptídeos individuais, múltiplos. Esta abordagem elimina a produção e processamento enzimático de poliproteínas e pode aumentar显著mente rendimento de polipeptídeo dirigido por um simples promotor.

Vetores usados em transformação usualmente conterão um marcador selecionável usado para identificar transformantes. Em sistemas bacteriais, isto pode incluir um gene de resistência a antibióticos como ampicilina ou canamicina. Marcadores selecionáveis para uso em células cultivadas de mamíferos incluem genes que conferem resistência a drogas, como neomicina, higromicina e metotrexate. O marcador selecionável pode ser um marcador selecionável amplificável. Um marcador selecionável amplificável é o gene DHFR. Um outro marcador amplificável é o ADNr DHFR (Simonsen and Levinson 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495). Marcadores selecionáveis são revistos por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA) e a escolha de

marcadores selecionáveis está bem dentro do nível de conhecimento comum da técnica.

Marcadores selecionáveis podem ser introduzidos na célula num plasmídeo separado ao mesmo tempo como o gene de interesse, ou eles podem ser introduzidos sobre o mesmo plasmídeo. Se sobre o mesmo plasmídeo, o marcador selecionável e o gene de interesse podem estar sob o controlo de diferentes promotores ou o mesmo promotor, o último arranjo produzindo uma mensagem dicistrônica. Constructos deste tipo são conhecidos na técnica (por exemplo, patente US N° 4,713,339).

Os elementos de expressão dos sistemas de expressão variam em suas resistências e especificidades. Dependendo do sistema hospedeiro/vetor utilizado, qualquer um de um número de elementos de transcrição e tradução apropriados, incluindo promotores constitutivos e induzíveis, pode ser usado no vetor de expressão. Por exemplo, quando clonando em sistemas bacteriais, promotores induzíveis como pL de bacteriófago λ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-Iac) e semelhantes podem ser usados; quando clonando em sistemas de células de insetos, promotores, tais como o pro-motor poliedron baculovírus podem ser usados; quando clonando em sistemas de célula de planta, promotores derivados do genoma de células de plantas (por exemplo, promotores de choque térmica; o promotor para a subunidade pequena de RUBISCO; o promotor para a proteína de ligação a/b de clorofila) ou de vírus de plantas (por exemplo, o promotor 35S ARN de CaMV; o promotor proteína de revestimento de TMV) pode ser usado; quando clonando em sistemas de células mamíferas, promotores derivados do genoma de células mamíferas (por exemplo, promotor metalotioneína) ou de vírus mamíferos (por exemplo, o

promotor posterior de adenovírus); o promotor de 7,5 K de vírus vaccinia) pode ser usado; quando gerando linhas de células que contêm múltiplas cópias de produto de expressão, vetores baseados em SV40, BPV e EBV podem ser usados com um apropriado marcador selecionável.

Em casos onde vetores de expressão em plantas são usados, a expressão de sequências codificando formas lineares ou não-ciclizadas das proteínas quiméricas da invenção pode ser dirigida através de qualquer um de um número de promotores. Por exemplo, promotores virais, tais como os promotores 35S ARN e 19S ARN de CaMV (Brisson et al. 1984, nature 310:511-514), ou o promotor proteína de revestimento de TMV (Takamatsu et al., 1987, EMBO J. 6:307-311) pode ser usado; alternativamente, promotores de plantas como a subunidade pequena de RUBISCO (Coruzzi et al. 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie et al. 1984:, Science 224:838-843) ou promotores de choque térmico, por exemplo, soja hsp17.5-E ou hsp17.3-B (Gurley et al. 1986, Mal. Cell. Biol. 6:559-565) pode ser usado. Estes constructos podem ser introduzidos em células de plantas usando plasmídeos Ti, plasmídeos Ri, vetores de vírus de planta, transformação de ADN direta, micro-injeção, eletroporação, etc. Para revisões de tais técnicas ver, por exemplo, Weissbach & Weissbach 1988, Methods for Plant Molecular Biology, academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463; e Grierson & Corey 1988, Plant Molecular Biology, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9.

Em um sistema de expressão em inseto que pode ser usado para produção de proteínas quiméricas da invenção, vírus de polihidrose nuclear *Autographa californica* (AcNPV) é usado como um vetor para expressar os genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. Uma

sequência codificante pode ser clonada em regiões não-essenciais (por exemplo, o gene poliedron) do vírus e colocado sob controlo de um promotor AcNPV (por exemplo, o promotor poliedron). Inserção bem-sucedida de uma sequência codificante resultará em inativação do gene poliedron e produção de vírus recombinante não-ocluído (isto é, vírus carecendo de revestimento protéico codificado pelo gene poliedron). Estes vírus recombinantes são então usados para infecção de células de *Spodoptera frugiperda* onde o gene inserido é expresso (ver, por exemplo, Smith *et al.* 1983, *J. Virol.* 46:584; patente US N° 4 215 051). Ainda exemplos deste sistema de expressão podem ser encontrados em Ausubel *et al.*, eds. 1989, *Current protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publish. Assoe. & Wiley Interscience.

Um outro sistema que pode ser usado para expressar as proteínas quiméricas da invenção é o sistema de expressão de gene glutamina sintetase, também referido como o "sistema de expressão GS" (Lonza Biologics PLC, Berkshire UK). Este sistema de expressão é descrito em detalhes na patente US N° 5 981 216.

Em células hospedeiras mamíferas, um número de sistemas de expressão baseados em vírus pode ser utilizado. Em casos onde um adenovírus é usado como um vetor de expressão, uma sequência codificante pode ser ligada a um complexo de controlo de transcrição/tradução adenovírus, por exemplo, o promotor late e sequência líder tripartite. Este gene químérico então pode ser inserido no genoma de adenovírus através de recombinação *in vitro* ou *in vivo*. Inserção Numa região não-essencial do genoma viral (por exemplo, região E1 ou E3) resultará em um vírus recombinante que é viável e capaz de expressar peptídeo em hospedeiros infectados

(ver, por exemplo, Logan & Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655). Alternativamente, o promotor de 7,5 K vaccinia pode ser usado (ver, por exemplo, Mackett et al. 1982, proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415; Mackett et al. 1984, J. Virol. 49:857; Panicali et al. 1982, proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4927).

Em casos onde um adenovírus é usado como um vetor de expressão, uma sequência codificante pode ser ligada a um complexo de controlo de transcrição/tradução adenovírus, por exemplo, o promotor late e sequência líder tripartite. Este gene quimérico então pode ser inserido no genoma de adenovírus através de recombinação *in vitro* ou *in vivo*. Inserção Numa região não-essencial do genoma viral (por exemplo, região E1 ou E3) resultará em um vírus recombinante que é viável e capaz de expressar peptídeo em hospedeiros infectados (ver, por exemplo, Logan & Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655). Alternativamente, o promotor de 7,5 K vaccinia pode ser usado (ver, por exemplo, Mackett et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415; Mackett et al. 1984, J. Virol. 49:857; Panicali et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4927).

Células hospedeiras contendo constructos de ADN da proteína quimérica são desenvolvidas em um meio de crescimento apropriado. Como aqui usado, o termo "meio de crescimento apropriado" significa um meio contendo nutrientes requeridos para o crescimento de células. Nutrientes requeridos para crescimento de células podem incluir uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogénio, aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e fatores de crescimento. Opcionalmente os meios podem conter soro de bezerro bovino ou soro fetal de bezerro. Numa modalidade,

os meios substancialmente não contêm IgG. O meio de crescimento geralmente selecionará para células contendo o constructo de ADN através de, por exemplo, seleção de droga ou deficiência em um nutriente essencial que é complementado pelo marcador selecionável sobre o constructo de ADN ou co-transfектado com o constructo de ADN. Células mamíferas cultivadas são geralmente desenvolvidas em meios livres de soro ou contendo soro comercialmente disponível (por exemplo, MEM, DMEM). Seleção de um meio apropriado para a particular linha de células usada está dentro do nível de conhecimento na técnica.

A proteína quimérica produzida recombinantemente da invenção pode ser isolada dos meios de cultura. O meio de cultura a partir de células hospedeiras transformadas ou transfectadas apropriadamente crescidas é separado do material de célula, e a presença de proteínas quiméricas é demonstrada. Um processo de deteção de proteínas quiméricas, por exemplo, é através de ligação das proteínas quiméricas ou porções das proteínas quiméricas a um anticorpo específico reconhecendo a proteína quimérica da invenção. Um anticorpo proteína antiquimérica pode ser um anticorpo monoclonal ou policlonal elevado contra a proteína quimérica em questão. Por exemplo, a proteína quimérica contém pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina. Anticorpos reconhecendo a região constante de muitas imunoglobulinas são conhecidos na técnica e são comercialmente disponíveis. Um anticorpo pode ser usado para realizar ELISA ou western blot para detectar a presença da proteína quimérica da presente divulgação, por exemplo proteína quimérica da presente invenção.

A proteína quimérica da invenção pode ser sintetizada em um animal transgénico, tal como um roedor, vaca, porco, carneiro ou cabra. O termo "animais transgénicos" refere-se a animais não-humanos que incorporaram um gene estranho em seu genoma. Devido este gene estar presente em tecidos de linha germe, ele é passado de parente para a descendência. Genes exógenos são introduzidos em embriões celled-simples (Brinster *et al.* 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438). Processos de produção de animais transgénicos são conhecidos na técnica, incluindo transgénicos que produzem moléculas de imunoglobulina (Wagner *et al.* 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6376; McKnight *et al.* 1983, Cell 34:335; Brinster *et al.* 1983, Nature 306:332; Ritchie *et al.* 1984, Nature 312:517; Baldassarre *et al.* 2003, Theriogenology 59:831; Robl *et al.* 2003, Theriogenology 59:107; Malassagne *et al.* 2003, Xenotransplantation 10(3):267).

A proteína quimérica da invenção também pode ser produzida através de uma combinação de química sintética e técnicas recombinantes.

Por exemplo, a porção de uma região constante de imunoglobulina pode ser expressa recombinantemente como descrito acima. A molécula biologicamente ativa, pode ser produzida usando técnicas de síntese química conhecidas (por exemplo, síntese de fase sólida).

A porção de uma região constante de imunoglobulina pode ser ligada à molécula biologicamente ativa usando química de ligação apropriada e então combinada com uma porção de uma região constante de imunoglobulina que não foi ligada a uma molécula biologicamente ativa para formar a proteína quimérica da invenção. Numa modalidade, a porção de uma

região constante de imunoglobulina é um fragmento Fc. O fragmento Fc pode ser produzido recombinantemente para formar Cys-Fc e reagido com uma molécula biologicamente ativa expressando um tioéster para obter um híbrido monômero-dímero. Numa outra modalidade, um Fc-tioéster é obtido e reagido com uma molécula biologicamente ativa expressando uma cisteína em término N (Figura 4).

Numa modalidade, a porção de uma região constante de imunoglobulina ligada à molécula biologicamente ativa formará homodímeros. Os homodímeros podem ser interrompidos através de exposição de homodímeros a condições desnaturantes e redutoras (por exemplo, p-mercapto etanol e ureia 8M) e então subsequentemente combinados com uma porção de uma região constante de imunoglobulina não ligada a uma molécula biologicamente ativa para formar híbridos monômero-dímero. Os híbridos monômero-dímero são então renaturados e novamente dobrados através de diálise em PBS e isolados, por exemplo, por cromatografia de exclusão de tamanho ou afinidade.

Numa outra modalidade, a porção de uma região constante de imunoglobulina formará homodímeros antes de ser ligada a uma molécula biologicamente ativa. Nesta modalidade, condições de reação para ligação de molécula biologicamente ativa ao homodímero podem ser ajustadas de modo que ligação da molécula biologicamente ativa a somente uma cadeia do homodímero é favorecida (por exemplo, através de ajuste de equivalentes molares de cada reagente).

A molécula biologicamente ativa pode ser quimicamente sintetizada com uma cisteína terminal N. A sequência codificando uma porção de uma região constante de

imunoglobulina pode ser subclonada em um vetor codificando inteína ligada a um domínio de ligação quitina (New England Biolabs, Beverly, MA). A inteína pode ser ligada ao término C da porção de uma região constante de imunoglobulina. Numa modalidade, a porção da imunoglobulina com a inteína ligada a seu término C pode ser expressa Numa célula procariótica. Numa outra modalidade, a porção da imunoglobulina com a inteína ligada a seu término C pode ser expressa numa célula eucariótica. A porção de região constante de imunoglobulina ligada a inteína pode ser reagida com MESNA. Numa modalidade, a porção de uma região constante de imunoglobulina ligada a inteína é ligada a uma coluna, por exemplo, uma coluna quitina e então eluída com MESNA. A molécula biologicamente ativa e porção de uma imunoglobulina podem ser reagidas juntas de modo a ocorrer rearranjo nucleofílico e a molécula biologicamente ativa seja covalentemente ligada à porção de uma imunoglobulina via uma ligação amida. (Dawson *et al.* 2000, *Annu. Rev. Biochem.* 69:923). A proteína quimérica sintetizada desta maneira opcionalmente pode incluir um peptídeo ligante entre a porção de uma imunoglobulina e a molécula biologicamente ativa. O ligante pode ser, por exemplo, sintetizado sobre o término N da molécula biologicamente ativa. Ligantes podem incluir peptídeos e/ou moléculas orgânicas (por exemplo, polietileno glicol e/ou sequências de aminoácidos curtas). Esta síntese recombinante e química combinada permite a rápida seleção de moléculas biologicamente ativas e Ligantes para otimizar desejadas propriedades da proteína quimérica da invenção, por exemplo, inibição viral, hemostase, produção de células vermelhas de sangue, meia-vida biológica, estabilidade, ligação a proteínas de soro ou alguma outra propriedade da proteína quimérica. O processo também permite a

incorporação de aminoácidos não-naturais na proteína quimérica da invenção que pode ser útil para otimização de uma desejada propriedade da proteína quimérica da invenção. Se desejado, a proteína quimérica produzida através deste processo pode ser novamente dobrada para uma conformação biologicamente ativa usando condições conhecidas na técnica, por exemplo, condições redutoras e então lentamente dialisada em PBS.

Alternativamente, a cisteína terminal-N pode estar sobre a porção de uma região constante de imunoglobulina, por exemplo, um fragmento Fc. Um fragmento Fc pode ser gerado com uma cisteína terminal-N tomando vantagem do fato de que um Fc nativo numa cisteína na posição 226 (ver Kabat *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, MD).

Para expor uma cisteína terminal, um fragmento Fc pode ser expresso recombinantemente. Numa modalidade, o fragmento Fc é expresso Numa célula procariótica, por exemplo, *E. coli*. A sequência codificando a porção Fc começando com Cys 226 (numeração EU) pode ser colocada seguindo imediatamente uma sequência extremidade codificando um peptídeo sinal, por exemplo, OmpA, PhoA, STII. A célula procariótica pode sofrer choque osmótico para liberar o fragmento Fc recombinante. Numa outra modalidade, o fragmento Fc é produzido Numa célula eucariótica, por exemplo, uma célula CHO, uma célula BHK. A sequência codificando o fragmento de porção Fc pode ser colocada diretamente seguindo uma sequência codificando um peptídeo sinal, por exemplo, cadeia leve Igκ de camundongo ou sequência sinal K^b classe I MHC, de modo que quando a proteína quimérica recombinante é sintetizada por uma célula eucariótica, a sequência sinal será activada,

deixando uma cisteína terminal N que então pode ser isolada e reagida quimicamente com uma molécula transportando um tioéster (por exemplo, um tioéster terminal C se a molécula é compreendida por aminoácidos).

A cisteína terminal N sobre um fragmento Fc também pode ser gerada usando uma enzima que cliva seu substrato em seu término N, por exemplo, Fator Xa, enterocinase, e o produto isolado e reagido com uma molécula com um tioéster.

O fragmento Fc expresso recombinantemente pode ser usado para fabricação de homodímeros ou híbridos monômero-dímero.

Numa modalidade específica, um fragmento Fc é expresso com o peptídeo sinal interferon- α adjacente à Cys na posição 226. Quando um constructo codificando este polipeptídeo é expressa em células CHO, as células CHO clivam o peptídeo sinal em duas posições distintas (em Cys 226 e em Vai dentro de peptídeo sinal 2 aminoácidos à montante na direção de término N). Isto gera uma mistura de duas espécies de fragmentos Fc (uma com uma Vai terminal-N e uma com uma Cys terminal-N). Isto por sua vez resulta numa mistura de espécies diméricas (homodímeros com Vai terminal, homodímeros com Cys terminal e heterodímeros onde uma cadeia tem um terminal Cys e a outra cadeia tem um terminal Vai). Os fragmentos Fc podem ser reagidos com uma molécula biologicamente ativa tendo um tioéster terminal C e o resultante híbrido monômero-dímero pode ser isolado da mistura (por exemplo, por cromatografia de exclusão de tamanho. É contemplado quando outras sequências de peptídeo sinal são usadas para expressão de fragmentos Fc em células CHO uma mistura de espécies de

fragmentos Fc com pelo menos dois termini N diferentes será gerada.

Numa outra modalidade, uma Cys-Fc produzida recombinantemente pode formar um homodímero. O homodímero pode ser reagido com peptídeo que tem um ligante ramificado sobre o término C, onde o ligante ramificado tem dois tioésteres terminais C que podem ser reagidos com a Cys-Fc. Numa outra modalidade, a molécula biologicamente ativa tem um tioéster não-terminal simples que pode ser reagido com Cys-Fc. Alternativamente, o Ligante ramificado pode ter duas cisteínas terminais C que podem ser reagidas com um tioéster Fc. Numa outra modalidade, o ligante ramificado tem dois grupos funcionais que podem ser reagidos com o tioéster Fc, por exemplo, 2-mercaptop amina. A molécula biologicamente ativa pode ser compreendida por aminoácidos. A molécula biologicamente ativa pode incluir uma molécula orgânica pequena ou uma molécula inorgânica pequena.

F. Processos de Uso de Proteínas Quiméricas

As proteínas quiméricas da invenção têm muitos usos como será reconhecido por aqueles versados na técnica, incluindo, mas não limitado a processos de tratamento de um sujeito com uma doença ou condição. A doença ou condição pode incluir, mas não está limitada a, uma infecção viral, uma desordem hemostática, anemia, câncer, leucemia, uma condição inflamatória ou uma doença auto-imune (por exemplo, artrite, psoriase, lupus eritematoso, esclerose múltipla), ou uma infecção bacterial (ver, por exemplo, patentes US 6 086 875, 6 030 613, 6 485 726; WO 03/077834; US20030235536A1).

1. Processos de Tratamento de um Sujeito com uma Deficiência de Células Vermelhas de Sangue

A invenção refere-se a um processo de tratamento de um sujeito tendo uma deficiência de células vermelhas de sangue, por exemplo, anemia, compreendendo administração de uma quantidade terapeuticamente efetiva de pelo menos uma proteína quimérica, onde a proteína quimérica compreende uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde a primeira cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e pelo menos um agente capaz de induzir proliferação de células vermelhas de sangue, por exemplo, EPO, e a segunda cadeia de polipeptídeo compreende pelo menos uma porção de uma imunoglobulina sem o agente capaz de induzir proliferação de células vermelhas de sangue da primeira cadeia.

2. Processos de tratamento de um sujeito com uma infecção viral

A invenção refere-se a um processo de tratamento de um sujeito tendo uma infecção viral ou exposto a um vírus compreendendo administração de uma quantidade terapeuticamente efetiva de pelo menos uma proteína quimérica, onde a proteína quimérica compreende uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde a primeira cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e pelo menos um agente antiviral, por exemplo, um inibidor de fusão ou interferon α e a segunda cadeia de polipeptídeo compreende pelo menos uma porção de uma imunoglobulina sem o agente antiviral da primeira cadeia. Numa modalidade, o sujeito está infectado com um vírus que pode ser tratado com IFNa, por exemplo,

vírus de hepatite C. Numa modalidade, o sujeito está infectado com VIH, tal como VIH-1 ou VIH-2.

Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção inibe replicação viral. Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção previne ou inibe entrada viral em células alvos, pelo que interrompendo, prevenindo, ou limitando a disseminação de uma infecção viral em um sujeito e diminuindo a carga viral em um sujeito infectado. Através de ligação de uma porção de uma imunoglobulina a um inibidor de fusão viral a invenção provê uma proteína quimérica com atividade inibidora de fusão viral com maior estabilidade e maior biodisponibilidade comparado a inibidores de fusão viral sozinhos, por exemplo, T20, T21, T1249. Assim, Numa modalidade, o inibidor de fusão viral diminui ou previne infecção de VIH sobre uma célula alvo, por exemplo, VIH-1.

a. Condições que podem ser tratadas

A proteína quimérica da invenção pode ser usada para inibir ou prevenir a infecção de uma célula alvo por um vírus de hepatite, por exemplo, vírus de hepatite C. A proteína quimérica pode compreender um agente antiviral que inibe replicação viral.

Numa modalidade, a proteína quimérica da invenção compreende um inibidor de fusão. A proteína quimérica da invenção pode ser usada para inibir ou prevenir a infecção de qualquer célula alvo por qualquer vírus (ver, por exemplo, patentes US N°s 6 086 875, 6 030 613, 6 485 726; WO 03/077834; US2003-0235536A1). Numa modalidade, o vírus é um vírus envelopado tal como, mas não limitado a, VIH, SIV, sarampo, influenza, vírus Epstein-Barr, vírus

sincício respiratório, ou vírus para influenza. Numa outra modalidade, o vírus é um vírus não-envelopado, tal como vírus rhino ou vírus de pólio.

A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar um sujeito já infectado com um vírus. O sujeito pode estar agudamente infectado com um vírus. Alternativamente, o sujeito pode estar cronicamente infectado com um vírus. A proteína quimérica da invenção também pode ser usada para tratar profilaticamente um sujeito em risco de contrair uma infecção viral, por exemplo, um sujeito conhecido ou acredita estar em contato próximo com um vírus ou sujeito acreditado estar infectado ou transportando um vírus. A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar um sujeito que pode ter sido exposto a um vírus, mas que ainda não foi diagnosticado positivamente.

Numa modalidade, a invenção refere-se a um processo de tratamento de um sujeito infectado com HCV compreendendo administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma proteína quimérica, onde a proteína quimérica compreende um fragmento Fc de uma IgG Numa citocina, por exemplo, IFN α .

Numa modalidade, a invenção refere-se a um processo de tratamento de um sujeito infectado com VIH compreendendo administração para o sujeito de uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma proteína quimérica onde a proteína quimérica compreende um fragmento Fc de uma IgG e o inibidor de fusão viral compreende T20.

3. Processos de Tratamento de um Sujeito Tendo uma Desordem Hemostática

A presente divulgação refere-se a um processo de tratamento de um sujeito tendo uma desordem hemostática compreendendo administração de uma quantidade terapeuticamente efetiva de pelo menos uma proteína quimérica, onde a proteína quimérica compreende uma primeira e uma segunda cadeia, onde a primeira cadeia compreende pelo menos um fator de coagulação e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e a segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina.

A proteína quimérica da invenção trata ou previne uma desordem hemostática através de promoção de formação de um coágulo de fibrina. A proteína quimérica da invenção pode ativar qualquer membro de uma cascata de coagulação. O fator de coagulação pode ser um participante no caminho extrínseco, o caminho intrínseco, ou ambos. Numa modalidade, o fator de coagulação é Fator VII ou Fator Vila. Fator Vila pode ativar Fator X que interage com Fator Va para clivar, protrombina a trombina, que por sua vez cliva fibrinogénio em fibrina. Numa outra modalidade, o fator de coagulação é Fator IX ou Fator IXa. Ainda Numa outra modalidade, o fator de coagulação é Fator VIII ou Fator Vllla. Ainda Numa outra modalidade, o fator de coagulação é Fator de von Willebrand, Fator XI, Fator XII, Fator V, Fator X ou Fator XIII.

a. Condições que podem ser tratadas

A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar qualquer desordem hemostática. As desordens hemostáticas que podem ser tratadas através de administração da proteína quimérica da invenção incluem, mas não são limitadas a, hemofilia A, hemofilia S, doença

de von Willebrand deficiência de Fator XI (deficiência PTA), deficiência de Fator XII, assim como deficiências ou anormalidades estruturais em fibrinogénio, protrombina, Fator V, Fator VII, Fator X, ou Fator XIII.

Numa modalidade/forma de realização, a desordem hemostática é uma desordem herdada. Numa modalidade, o sujeito tem hemofilia A, e a proteína quimérica compreende Fator VIII ou Fator VIIIa. Numa outra modalidade, o sujeito tem hemofilia A e a proteína quimérica compreende Fator VII ou Fator VIIa. Numa outra modalidade, o sujeito tem hemofilia S e a proteína quimérica compreende Fator IX ou Fator IXa. Numa outra modalidade, o sujeito tem hemofilia S e a proteína quimérica compreende Fator VII ou Fator VIIa. Numa outra modalidade, o sujeito tem anticorpos inibidores para Fator VIII ou Fator VIIIa e a proteína quimérica compreende Fator VII ou Fator VIIa. Ainda Numa outra modalidade, o sujeito tem anticorpos inibidores contra Fator IX ou Fator IXa e a proteína quimérica compreende Fator VII ou Fator VIIa.

A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar pro-filaticamente um sujeito com uma desordem hemostática. A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar um episódio de sangramento agudo em um sujeito com uma desordem hemostática.

Numa modalidade, a desordem hemostática é o resultado de uma deficiência em um fator de coagulação, por exemplo, Fator IX, Fator VIII. Numa outra modalidade/forma de realização a desordem hemostática pode ser o resultado de um fator de coagulação defeituoso, por exemplo, Fator de von Willebrand.

Numa outra modalidade/forma de realização a desordem hemostática pode ser uma desordem adquirida. A desordem adquirida pode resultar de uma doença ou condição secundária subjacente. A condição não-relacionada pode ser, por exemplo, mas não como uma limitação, câncer, uma doença autoimune, ou gravidez. A desordem adquirida pode resultar de velhice ou de medicação para tratar uma desordem secundária subjacente (por exemplo, quimioterapia de cancro).

4. Processos de tratamento de um sujeito em necessidade de um agente hemostático geral

A invenção também se refere a processos de tratamento de um sujeito que não tem uma desordem hemostática ou uma doença ou condição secundária resultando em aquisição de uma desordem hemostática. A invenção assim refere-se a um processo de tratamento de um sujeito em necessidade de um agente hemostático genérico compreendendo administração de uma quantidade terapeuticamente efetiva de pelo menos uma proteína quimérica, onde a proteína quimérica compreende uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos onde a primeira cadeia de polipeptídeo compreende pelo menos uma porção de uma região constante de, imunoglobulina e pelo menos um fator de coagulação e a segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina sem o fator de coagulação da primeira cadeia de polipeptídeo.

a. Condições que podem ser tratadas

Numa modalidade, o sujeito em necessidade de um agente hemostático geral é sofrendo, ou está perto de sofrer, cirurgia. A proteína quimérica da invenção pode ser

administrada antes de ou após cirurgia como um profilático. A proteína quimérica da invenção pode ser administrada durante ou após cirurgia para controlar um episódio de sangramento agudo. A cirurgia pode incluir, mas não é limitada a, transplante de fígado, ressecção de fígado, ou transplante célula tronco.

A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar um sujeito tendo um episódio de sangramento agudo que não tem uma desordem hemostática. O episódio de sangramento agudo pode resultar de trauma severo, por exemplo, cirurgia, um acidente de automóvel, ferimento, lacerção de disparo de arma, ou qualquer outro evento traumático resultando em sangramento descontrolado.

5. Modalidades de Tratamento

A proteína quimérica da invenção pode ser administrada intravenosamente, subcutaneamente, intramuscularmente, ou via qualquer superfície de mucosa, por exemplo, oralmente, sublingualmente, bucalmente, nasalmente, retalmente, vaginalmente ou via pulmonar. A proteína quimérica pode ser implantada dentro ou ligada a um suporte sólido de biopolímero que permite a lenta liberação da proteína quimérica para o sítio desejado.

A dose da proteína quimérica da invenção irá variar dependendo do sujeito e com a via particular de administração usada. Dosagens podem variar de 0,1 a 100 000 µg/kg de peso de corpo. Numa modalidade, o intervalo de dosagem é 0,1-1000 µg/kg. A proteína pode ser administrada continuamente ou em específicos intervalos de tempo. Ensaios *in vitro* podem ser empregues para determinar intervalos de dose ótima e/ou programas para

administração. Muitos ensaios *in vitro* que medem infectividade viral são conhecidos na técnica. Por exemplo, um ensaio de transcriptase reversa, ou um ensaio PCR ta ou ensaio de ADN ramificado pode ser usado para medir concentrações de VIH. Um ensaio StaClot pode ser usado para medir atividade de coagulação. Adicionalmente, doses efetivas podem ser extrapoladas de curvas de dose resposta obtidas de modelos animais.

A invenção também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de fusão viral, pelo menos uma porção de uma imunoglobulina e um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável. Exemplos de apropriados veículos farmacêuticos são descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences por E.W. Martin. Exemplos de excipientes podem incluir amido, glicose, lactose, sucrose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, sílica gel, estearato de sódio, mono estearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado seco, glicerol, propileno, glicol, água, etanol, e semelhantes. A composição também pode conter reagentes de tamponamento de pH, e agentes umectantes ou emulsificantes.

Para administração oral, a composição farmacêutica pode tomar a forma de comprimidos ou cápsulas preparadas por meios convencionais. A composição também pode ser preparada como um líquido, por exemplo, um xarope ou uma suspensão. O líquido pode incluir agentes de suspensão (por exemplo, xarope de sorbitol, derivados de celulose, ou gorduras comestíveis hidrogenadas), agentes emulsificantes (lecitina ou acácia), veículos não aquosos (por exemplo, óleo de amêndoas, ésteres oleosos, álcool etílico, ou óleos vegetais fracionados), e conservantes (por exemplo, p-hidróxi benzoatos de metila ou propila ou

ácido sórbico). As preparações também podem incluir agentes aromatizantes, corantes e adoçantes. Alternativamente, a composição pode ser apresentada como um produto seco para constituição com água ou um outro veículo apropriado.

Para administração bucal e sublingual a composição pode tomar a forma de comprimidos, losangos ou filmes de rápida dissolução de acordo com protocolos convencionais.

Para administração através de inalação, os compostos para uso de acordo com a presente invenção são convenientemente liberados na forma de um spray aerossol de uma embalagem pressurizada ou nebulizador (por exemplo, em PBS), com um propelenete apropriado, por exemplo, dicloro diflúor metano, tricloro flúor metano, dicloro tetra flúor metano, dióxido de carbono ou outro gás apropriado. No caso de um aerossol pressurizado a dosagem unitária pode ser determinada através de provimento de uma válvula para liberação de uma quantidade medida. Cápsulas e cartuchos de, por exemplo, gelatina para uso em um inalador ou insuflador podem ser formuladas contendo uma mistura pulverizada do composto e uma apropriada base pulverizada como lactose ou amido.

A composição farmacêutica pode ser formulada para administração parenteral (isto é, intravenosa ou intramuscular) através de injeção de quantidade relativamente grande; Formulações para injeção podem ser apresentadas em forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes multidoses com um conservante adicionado. As composições podem tomar formas, tais como suspensões, soluções, ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e conterem agentes de formulação como agentes de

suspensão, estabilização e/ou dispersão. Alternativamente, o ingrediente ativo pode estar em forma pulverizada para constituição com um veículo apropriado, por exemplo, água livre de pirogênio.

A composição farmacêutica também pode ser formulada para administração retal como um supositório ou enema de retenção, por exemplo, contendo convencionais bases de supositório como manteiga de cacau ou outros glicerídeos.

6. Terapia de Combinação

A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar um sujeito com uma doença ou condição em combinação com pelo menos um outro agente conhecido para tratar a dita doença ou condição.

Numa modalidade, a invenção refere-se a um processo de tratamento de um sujeito infectado com VIH compreendendo administração de uma quantidade terapeuticamente efetiva de pelo menos uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia, onde a primeira cadeia compreende um inibidor de fusão de VIH e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e uma segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma imunoglobulina sem um inibidor de fusão de VIH da primeira cadeia, em combinação com pelo menos um outro agente anti-VIH. O dito outro agente anti-VIH pode ser qualquer terapêutico que tenha demonstrado atividade anti-VIH. O dito outro agente anti-VIH pode incluir, por exemplo, mas não como limitação, um inibidor de protease (por exemplo, Amprenavir™, Crixivan™, Ritonivir™), um análogo de nucleosídeo transcriptase reversa (por exemplo, AZT, 001, 04T, 3TC, Ziagen™), um inibidor de transcriptase reversa

análogo não-nucleosídeo (por exemplo, Sustiva™), um outro inibidor de fusão de VIH, um anticorpo neutralizante específico para VIH, um anticorpo específico para C04, uma imitação C04, por exemplo, proteína de fusão C04-lgG2 (pedido de patente US 09/912 824) ou um anticorpo específico para CCR5, ou CXCR4 ou um parceiro de ligação específico de CCR5, ou CXCR4.

Numa outra modalidade, a invenção refere-se a um processo de tratamento de um sujeito com um distúrbio hemostático compreendendo administração de quantidade terapeuticamente efetiva de pelo menos uma proteína quimérica compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia, onde a primeira cadeia compreende pelo menos um fator de coagulação e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e a segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina sem o fator de coagulação da primeira cadeia, em combinação com pelo menos um outro fator de coagulação ou agente que promove hemostase. O dito outro fator de coagulação ou agente que promove hemostase pode ser qualquer terapêutico com demonstrada atividade de coagulação. Como um exemplo, mas não como limitação, o fator de coagulação ou agente hemostático pode incluir Fator V, Fator VII, Fator VIII, Fator IX, Fator X, Fator XI, Fator XII, Fator XIII, protrombina, ou fibrinogénio ou formas ativadas de qualquer um dos anteriores. O fator de coagulação de agente hemostático também pode incluir drogas antifibrinolíticas, por exemplo, ácido épsilon amino capróico, ácido tranexâmico.

7. Processos de Inibição de Fusão Viral com uma Célula Alvo

A invenção também refere-se a um processo *in vitro* de inibição de fusão de VIH com uma célula mamífera compreendendo combinação de célula mamífera com pelo menos uma proteína quimérica, onde a proteína quimérica compreende uma primeira e uma segunda cadeia, onde a primeira cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e um inibidor de VIH e a segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina sem o inibidor de VIH da primeira cadeia. A célula mamífera pode incluir qualquer célula ou linha de célula suscetível a infecção por VIH incluindo, mas não limitado a, células CD4⁺ T humanas primárias ou macrófagos, células MOLT-4, células CEM, células AA5, ou células HeLa que expressam CD4 sobre superfície de célula.

G. Processos de Isolamento de Proteínas Quiméricas

Tipicamente, quando proteínas quiméricas da invenção são produzidas elas são contidas Numa mistura de outras moléculas, tais como outras proteínas ou fragmentos de proteínas. A invenção assim provê processos de isolamento de qualquer uma das proteínas quiméricas descritas acima a partir de uma mistura contendo as proteínas quiméricas. Foi determinado que as proteínas quiméricas da invenção se ligam a ligantes corantes sob condições apropriadas e que alteração daquelas condições subsequente a ligação pode interromper a ligação entre o ligante corante e a proteína quimérica, pelo que provendo um processo de isolamento de proteína quimérica. Em algumas modalidades a mistura pode compreender um híbrido monômero-dímero, um dímero e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, por exemplo, uma Fc. Assim, Numa modalidade, a invenção provê um processo de isolamento de

um híbrido monômero-dímero. Numa outra modalidade, a invenção provê um processo de isolamento de um dímero.

Da mesma maneira, Numa modalidade, a invenção provê um processo de isolamento de um híbrido monômero-dímero a partir de uma mistura, onde a mistura compreende

a) um híbrido monômero-dímero compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde a primeira cadeia compreende uma molécula biologicamente ativa, e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e onde a segunda cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina numa molécula biologicamente ativa ou região variável de imunoglobulina;

b) um dímero compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia de polipeptídeos, onde as primeira e segunda cadeias ambas compreendem uma molécula biologicamente ativa, e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina; e

c) uma porção de uma região constante de imunoglobulina; o dito processo compreendendo

1) contato de mistura com um ligante corante ligado a um suporte sólido sob condições apropriadas de modo que ambos, o híbrido monômero-dímero e o dímero ligam-se ao Ligante corante;

2) remoção de porção não-ligada de uma região constante de imunoglobulina;

3) alteração de condições apropriadas de 1) de modo que a ligação entre o híbrido monômero-dímero e o ligante corante ligado ao suporte sólido seja interrompida;

4) isolamento de híbrido monômero-dímero.

Nalgumas modalidades, antes de contato de mistura com um ligante corante, a mistura pode ser contactada com uma substância cromatográfica tal como proteína A sefarose ou semelhente. A mistura é eluída da substância cromatográfica usando um tampão de eluição apropriado (por exemplo, um tampão de baixo pH) e o eluato contendo a mistura é então contatado com o ligante corante.

Condições apropriadas para contato de mistura com o Ligante corante podem incluir um tampão para manter a mistura em um pH apropriado. Um pH apropriado pode incluir um pH de 3-10, 4-9, 5-8. Numa modalidade, o pH apropriado é 8,0. Qualquer agente tamponante conhecido na técnica pode ser usado tanto quanto mantenha o pH na apropriada faixa, por exemplo, tris, HEPES, PIPES, MOPS. Condições apropriadas também incluem um tampão de lavagem para eluir espécies não-ligadas do Ligante corante. O tampão de lavagem pode ser qualquer tampão que não interrompa ligação de uma espécie ligada. Por exemplo, o tampão de lavagem pode ser o mesmo tampão usado na etapa de contato.

Uma vez a proteína quimérica esteja ligada ao ligante corante, a proteína quimérica é isolada através de alteração de condições apropriadas. Alteração de condições apropriadas pode incluir a adição de um sal ao tampão. Qualquer sal pode ser usado, por exemplo, NaCl, KCl. O sal deve ser adicionado Numa concentração que é alta o suficiente para interromper a ligação entre o Ligante corante e as espécies desejadas, por exemplo, um híbrido monômero-dímero.

Em algumas modalidades onde a mistura é compreendida por uma Fc, um híbrido monômero-dímero, e um dímero, foi verificado que a Fc não se liga ao Ligante corante e assim

elui com o fluxo. O dímero se liga mais hermeticamente ao ligante corante que o híbrido monômero-dímero. Assim, uma maior concentração de sal é requerida para interromper a ligação (por exemplo, eluir) entre o dímero e o ligante corante em comparação à concentração de sal requerida para interromper a ligação entre o ligante corante e o híbrido monômero-dímero.

Em algumas modalidades NaCl pode ser usado para isolar o híbrido monômero-dímero da mistura. Em algumas modalidades, a apropriada concentração de sal que interrompe a ligação entre o ligante corante e o híbrido monômero-dímero é de 200-700 mM, 300-600 mM, 400-500 mM. Numa modalidade, a concentração de NaCl requerida para interromper a ligação entre o ligante corante e híbrido monômero-dímero é 400 mM.

NaCl também pode ser usado para isolar o dímero da mistura. Tipicamente, o híbrido monômero-dímero é isolado da mistura antes de dímero. O dímero é isolado por adição de uma apropriada concentração de sal ao tampão, pelo que interrompendo a ligação entre o ligante corante e o dímero. Em algumas modalidades a apropriada concentração de sal que interrompe a ligação entre o Ligante corante e o dímero é de 800 mM a 2 M, 900 mM a 1,5 M, 950 mM a 1,2 M. Numa modalidade específica, NaCl 1M é usado para interromper a ligação entre o Ligante corante e o dímero.

O ligante corante pode ser um bio-mimético. Um bio-mimético é uma substância feita pelo homem, dispositivo, ou sistema que imita natureza. Assim, em algumas modalidades o Ligante corante imita um ligante ocorrendo naturalmente da molécula. O ligante corante pode ser escolhido de Mimetic Red1™, Mimetic Red2™, Mimetic Orange

1TM, Mimetic Orange 2TM, Mimetic Orange 3TM, Mimetic Yellow 1TM, Mimetic Yellow 2TM, Mimetic Green 1TM, Mimetic Blue 1TM, e Mimetic Blue 2TM (Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ). Numa modalidade específica, o ligante corante é Mimetic Red 2TM (Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ). Em certas modalidades o ligante corante está ligado a um suporte sólido, por exemplo, de Mimetic Orange 2 A6XLTM, Mimetic Orange 3 A6XLTM, Mimetic Yellow 1 A6XLTM, Mimetic Yellow 2 A6XLTM, Mimetic Green 1 A6XLTM, Mimetic Blue 1 A6XLTM, e Mimetic Blue 2 A6XLTM (Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ).

O ligante corante pode estar ligado a um suporte sólido. O suporte sólido pode ser qualquer suporte sólido conhecido na técnica (ver, por exemplo, www.seperationsNOW.com). Exemplos de suportes sólidos podem incluir uma conta, um gel, uma membrana, uma nanopartícula, ou uma microesfera. O suporte sólido pode compreender qualquer material que possa ser ligado a um ligante corante (por exemplo, agarose, poliestireno, sefarose, sephadex). Suportes sólidos podem compreender qualquer polímero orgânico sintético tal como poliacrílico, polímeros vinila, acrilato, polimetacrilato, e poliacrilamida. Suportes sólidos também podem compreender um polímero carboidrato, por exemplo, agarose, celulose ou dextrano. Suportes sólidos podem compreender óxidos inorgânicos, como sílica, zirconia, titânia, céria, alumina, magnésia (isto é, óxido de magnésio), ou óxido de cálcio. Suportes sólidos também podem compreender combinações de alguns dos suportes mencionados acima incluindo, mas não limitado a, dextrano-acrilamida.

Exemplos

Exemplo 1: Peso molecular afeta transcitose mediada por FcRn

Proteínas quiméricas compreendidas por varias proteínas de interesse e IgG Fc foram recombinantemente produzidas (Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed.;. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) ou no caso de contactina-Fc, MAB- β -gal (um complexo de um anticorpo monoclonal ligado a β -gal) (Biodesign International, Saco, ME) e MAB-GH (um complexo de anticorpo monoclonal e hormónio de crescimento) (Research Diagnostics, Inc. Flanders, NJ) foram adquiridos comercialmente. Resumidamente, os genes codificando a proteína de interesse foram clonados por PCR, e então subclonados em um plasmídeo de expressão de fusão Fc. Os plasmídeos foram transfetados em células DG44 CHO e transfetantes estáveis foram selecionados e amplificados com metotrexato. Os homodímeros de proteína quimérica foram purificados sobre uma coluna de proteína A. As proteínas testadas incluíram interferon α , hormónio de crescimento, eritropoietina, hormónio de estimulação de folículo, Fator IX, β galactosidase, contactina, e Fator VIII. Ligação de proteínas a porções de imunoglobulina, incluindo o parceiro de ligação de receptor de FcRn, ou usando complexos comercialmente disponíveis de anticorpo inteiro (incluindo a região de ligação de FcRn) - antígeno permitiu a investigação de transcitose como uma função de peso molecular (ver patente US 6,030,613). As proteínas quiméricas foram administradas a ratos oralmente e níveis em soro foram medidos 2-4 horas após administração usando um ELISA para proteínas quiméricas produzidas recombinantemente e ambos, um western blot e ELISA para complexos anticorpos obtidos comercialmente e proteínas quiméricas. Adicionalmente, todos as proteínas ou

complexos obtidos comercialmente assim como controlos Fator VIII-Fc, Fator IX-Fc e Epo-Fc foram iodados usando contas 1000 (Pierce, Pittsburgh, PA). Os resultados indicaram que níveis em soro de Fc e proteínas químéricas de anticorpo monoclonal administrados oralmente a ratos são diretamente relacionados ao tamanho da proteína. O ponto de corte aparente para proteínas químéricas Fc administradas oralmente está entre 200-285 kO (Tabela 2).

Tabela 2

| Proteína | Tamanho (kD) | Transcitosose |
|--------------------|--------------|---------------|
| IFN α -Fc | 92 | ++++ |
| GH-Fc | 96 | +++ |
| Epo-Fc | 120 | +++ |
| FSH-Fc | 170 | +++ |
| MAB:GH | 172-194 | +++ |
| FIX-Fc | 200 | + |
| MAB: β Gal | 285-420 | - |
| Contactina-Fc | 300 | - |
| FVIII Δ -Fc | 380 | - |

Exemplo 2: Clonagem de pcADN 3.1-Flag-Fc

A sequência para o peptídeo FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys), um marcador de afinidade comum usado para identificar ou purificar proteínas, foi cionado no plasmídeo pcADN 3.1-Fc, que contém a sequência sinallgk de camundongo seguida pelo fragmento Fc de IgG1 humana (aminoácidos 221-447, numeração EU). O constructo foi criado por PCR sobreposição usando os seguintes iniciadores:

FlagFc-F1: 5'- GCTGGCTAGCCACCATGGA -3' (SEQ ID N°: 41)

FlagFc-R1: 5'- CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGTCACCAGTGG

AACCTGGAAC -3' (SEQ ID N°: 42)

FlagFc-F2: 5'- GACTACAAGG ACGACGATGA CAAGGACAAACTC ACACAT
GCCACCCTG CCCAGCTCCG GAACTCC -3' (SEQ ID N°: 43)

FlagFc-R2: 5'- TAGTGGATCCTCATTIACCCG -3' (SEQ ID N°: 44)

O molde pcADN 3.1-Fc foi então adicionado a duas reações PCR separadas contendo 50 pmol de cada um dos pares de iniciadores FlagFc-F1/R1 ou FlagFc-F2/R2 Numa reação de 50 μ L usando Pfu Ultra ADN polimerase (Stratagene, CA) de acordo com protocolo padrão de fabricante em um MJ Thermocycler usando os seguintes ciclos: 95°C 2 minutos; ciclos de (95°C 30 segundos, 52°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), seguido por 72°C por 10 minutos. Os produtos destas duas reações foram então misturados Numa outra reação PCR (2 μ L cada) com 50 pmoles de iniciadores FlagFc-F1 e FlagFc-R2 Numa reação de 50 μ L usando Pfu Ultra ADN polimerase (Stratagene, CA) de acordo com protocolo padrão do fabricante em um MJ Thermocycler usando os seguintes ciclos: 95°C 2 minutos; ciclos de (95°C 30 segundos, 52°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), seguido por 72°C por 10 minutos. O resultante fragmento foi purificado com gel, digerido e inserido no plasmídeo pcADN 3.1-Fc Nhel-Bam HI. O plasmídeo resultante contém a sequência sinal Igk de camundongo produzindo a proteína FlagFc.

Exemplo 3: Clonagem de constructo Fator VII-Fc

A sequência codificante para Fator VII, foi obtida por RT-PCR a partir de ARN de fígado fetal humano (Clontech, Paio Alto, CA). A região clonada é compreendida pela sequência de ADNc a partir de bp 36 para bp 1430 terminando justo antes de códon de interrupção. Um sítio Sbfl foi introduzido no término-N. Um sítio BspEI foi introduzido sobre o término-C. O constructo foi clonado por PCR usando os iniciadores:

Jusante: 5' GCTACCTGCAGGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGG 3' (SEQ ID N°: 45)

Montante: 5' CAGTICCGGAGCTGGGCACGGCGGGCACGTGTGAGTTIGTCGGG AAAT GG 3' (SEQ ID N°: 46)

e as seguintes condições: 95°C por 5 minutos seguido por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 45 segundos, e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos.

O fragmento foi digerido SbfI-BspE I e inserido em pED.dC-Fc um plasmídeo codificando o fragmento Fc de IgG1.

Exemplo 4: Clonagem de constructo Fator IX-Fc

A sequência codificando Fator IX humano, incluindo a sequência de pré-peptídeo, foi obtida por amplificação de RT-PCR a partir de ARN de fígado humano adulto usando os seguintes iniciadores:

natFIX-F: 5'-TTACTGCAGAAGGTTATGCAGCGCGTGAACATG- 3' (SEQ ID N°: 47)

F9-R: 5'-1 TTTTCGAATTCACTGAGCTTGTTCCTTAATCC- 3' (SEQ ID N°: 48)

20 ng de ARN de fígado humano adulto (Clontech, Paio Alto, CA) e 25 pmoles de cada iniciador foram adicionados a uma reação de RT-PCR usando o sistema SuperScript™. RT-PCR de uma etapa com sistema PLATINUM™ Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com protocolo de fabricantes. Reação foi realizada em um MJ Thermocycler usando os seguintes ciclos: 50°C 30 minutos; 94°C 2 minutos; 35 ciclos de (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 1 minuto), e um final de 72°C 10 minutos. O fragmento foi purificado em gel usando Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA), e

digerido com PstI-EcoRI, purificado em gel, e clonado na correspondente digestão do plasmídeo pED.dC.xFc.

Exemplo 5: Clonagem de constructo PACE

A sequência codificando PACE humana (enzima clivando aminoácido básico emparelhado), uma endoprotease, foi obtida por RT-PCR. Os seguintes iniciadores foram usados:

PACE-F1: 5'- GGTAAGCTGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTIGC -3' (SEQ ID N°: 49)

PACE-R1: 5'- GTITICAATCTCTAGGACCCACTCGCC -3' (SEQ ID N°: 50)

PACE-F2: 5'- GCCAGGCCACATGACTACTCCGC -3' (SEQ ID N°: 51)

PACE-R2: 5'- GGTGAATTCTCACTCAGGCAGGTGTGAGGGCAGC -3' (SEQ ID N°: 52)

O iniciador PACE-F1 adiciona um sítio HindIII à extremidade 5' da sequência PACE começando com 3 nucleotídeos antes de códon de partida, enquanto o iniciador PACE-R2 adiciona um códon de parada após aminoácido 715, que ocorre na extremidade de domínio extracelular de PACE, assim como adicionando um sítio EcoRI à extremidade 3' do códon de parada. Os iniciadores PACE-R1 e -F2 anelam sobre os lados 3' e 5' de um sítio BamHI interno, respectivamente. Duas reações RT-PCR foram então estabelecidas usando 25 pmoles de cada um dos pares de iniciadores de PACEF1/R1 ou PACE-F2/R2 com 20 ng de ARN de fígado humano adulto (Clonte-ch; Paio Alto, CA) Numa reação RT-PCR de 50 JJL usando o SuperScript™. RT-PCR de uma etapa com sistema PLATINUM Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com protocolo do fabricante. A reação foi realizada em um MJ Thermocycler usando os seguintes ciclos: 50°C 30 minutos; 94°C 2 minutos;ciclos de (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C

2 minutos), seguido por 72°C 10 minutos. Estes fragmentos foram ligados no vetor pGEM TEasy (Promega, Madison, WI) e inteiramente sequenciados. O fragmento F2-R2 foi então subclonado em pcADN6 V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando os sítios BamHI/EcoRI, e então o fragmento F1-R1 foi cionado neste constructo usando os sítios HindIII/BamHI. O plasmídeo final, pcADN6-PACE, produz uma forma solúvel de PACE (aminoácidos 1-715), na medida em que a região de transmembrana foi suprimida. A sequência de PACE em pcADN6-PACE é essencialmente como descrito em Harrison *et al.* 1998, *Seminars in Hematology* 35:4.

Exemplo 6: Clonagem de constructo de ligante de oito aminoácidos IFN α -Fc

A sequência codificando interferon α 2b humano (hIFN α), incluindo a sequência sinal, foi obtida por PCR a partir de ADN genómico humano usando os seguintes iniciadores:

IFN α -Sig-F: 5'-GCTACTGCAGCCACCATGGCCTTGACCTTGCTTAC-3'
(SEQ ID N°: 53)
IFN α -EcoR-R: 5'-CGTTGAATTCTCCTTACTTCTAACTTTCTTGC-3' (SEQ ID N°: 54)

ADN genómico foi preparado de linha de células astrocitoma humana 373MG, de acordo com processos padrões (Sambrook *et al.* 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press). Resumidamente, aproximadamente 2×10^5 células foram peletizadas por centrifugação, re-suspensas em 100 μ L de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4, então misturadas com igual volume de tampão de lise (Tris 100 mM pH 8,0/NaCl 1M / 2% SDS/ 5Mm eDTA). Proteinase K foi adicionada a uma concentração final de 100 μ g/mL, e a amostra foi digerida a

37°C por 4 horas com ocasional mistura suave. A amostra foi então extraída duas vezes com fenol: clorofórmio, o ADN precipitado através de adição de acetato de sódio pH 7,0 para 100 mM e um igual volume de isopropanol, e peletizado por centrifugação por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o pélete foi lavado uma vez com etanol 70% frio e deixado secar ao ar antes de re-suspensão em TE (Tris 10 mM pH 8,0/EDTA 1 mM).

100 ng deste ADN genómico foram então usados numa reação PCR de 25 µL com 25 pmoles de cada iniciador usando Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com protocolo padrão de fabricante num MJ Thermocycler usando os seguintes ciclos: 94°C 2 minutos; 30 ciclos de (94°C 30 segundos, 50°C 30 segundos, 72°C 25-45 segundos), e finalmente 72°C 10 minutos. A banda de tamanho esperado (~550 bp) foi purificada com gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA), digerida com PstI/EcoRI, novamente purificada com gel, e clonada no sítio PstI/EcoRI de pED.dC.XFc, que contém um Ligante de 8 aminoácidos (EFAGAAAV) seguido pela região Fc de IgG1 humana.

Exemplo 7: Clonagem de constructo IFN α Fc Δligante

1 µl de pED.dC.nativo humano IFN α Fc ADN, do Exemplo 6, foi então usado como um molde Numa reação PCR de 25 µl com 25 pmoles de cada iniciador IFN α -Sig-F e o seguinte iniciador:

h1FNaNoLinkFc-R: 5' CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCGGGCACGTGTGAG
TTTGCTTCCTTACTTCTTAAAC I I I I I I GCAAGTTIG- 3' (SEQ ID N°: 55)

A reação PCR foi realizada usando Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com o protocolo padrão do fabricante em um RapidCycler thermocycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT), desnaturando a 94°C por 2 minutos seguido por 18 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por segundo, e 72°C por 1 minuto com uma inclinação de 6, seguido por extensão em 72°C por 10 minutos. Um produto PCR do tamanho correto (~525 bp) foi purificado com gel usando um kit Gel Extraction (Qiagen; valencia, CA), digerido com as enzimas de restrição PstI e BspEI, purificado com gel, e subclonado nos correspondentes sítios de um pED.dC.XFc modificado, onde os aminoácidos 231-233 da região Fc foram alterados usando a degenerescência do código genético para incorporar um sítio BspEI enquanto mantendo a sequência de aminoácidos de tipo selvagem.

Exemplo 8: Clonagem de constructo IFN α Fc Ligante GS15

Um vetor cadeia principal novo foi criado usando a Fc encontrada em constructo Δligante (contendo sítios BspEI e RsrlI na extremidade 5' usando a degenerescência do código genético para manter a sequência de aminoácidos), usando este ADN como um molde para uma reação PCR com os seguintes iniciadores:

5' B2xGGGS: 5' gtcaggatccggcggtggagggagcgacaaaac
tcacacgtgcc 3' (SEQ ID N°: 56)
3' GGGGS: 5' tgacgcggccgctcatttacccggagacaggg 3' (SEQ ID N°:
57)

Uma reação PCR foi realizada com 25 pmoles de cada iniciador usando enzima Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA) de acordo com protocolo padrão de fabricante em um MJ Thermocycler usando o seguinte processo: 95°C 2 minutos; 30

ciclos de (95°C 30 segundos, 54°C 30 segundos, 72°C 2 minutos), 72°C 10 minutos. A banda de tamanho esperado (~730 bp) foi purificada com gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA), digerida com BamHIINotI; novamente purificada com gel, e clonada no vetor digerido BamHI/NotI de pcADN6 10, uma versão de pcADN6 com a sequência IRES e gene dhfr inseridos no sítio NotI/XbaI.

500 ng de pED.dc.ADN IFN α Fc humano nativo foram então usados como um molde Numa reação PCR de 25 μ l com os seguintes iniciadores:

5' IFN α for GGGGS: 5' ccgctagcctgcaggccaccatggccttgacc 3'
(SEQ ID N°: 58)

3' IFN α for GGGGS: 5'ccggatccgcccacccttccttactacgtaaac 3'
(SEQ ID N°: 59)

Uma reação PCR foi realizada com 25 pmoles de cada iniciador usando Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) de acordo com o protocolo padrão do fabricante em um MJ Thermocycler 15 usando os seguintes ciclos: 95°C 2 minutos; 14 ciclos de (94°C 30 segundos, 48°C 30 segundos, 72°C 1 minuto), 72°C 10 minutos. A banda de tamanho esperado (~600 bp) foi purificada em gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA), digerida com NheI/BamH1, novamente purificada com gel, e clonada no sítio NheI/BamHI do vetor pcADN6 10/Fc, acima, para criar uma fusão IFN α Fc com um ligante Gly/Ser de aminoácidos (2xGGGGS), pcADN610IFN α -GS10-Fc.

Uma reação PCR foi então realizada usando 500 ng deste pcADN6 ID(IFN α -GS10-Fc com os seguintes iniciadores:

5' B3XGGGGS: 5' (SEQ ID N°: 60)

gtcaggatccgggtggaggcggtccggcggtggagggagcacaactcacacgtgcc
c 3' (SEQ ID N°: 61)

fcclv-R: 5' atagaagccttgaccaggc 3' (SEQ ID N°: 62)

Uma reação PCR foi realizada com 25 pmoles de cada iniciador usando Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com protocolo padrão de fabricante em um MJ Thermocycler usando os seguintes ciclos: 95°C 2 minutos; 14 ciclos de (94°C 30 segundos, 48°C 30 segundos, 72°C 1 minuto), 72°C 10 minutos. A banda de tamanho esperado (504 bp) foi purificada em gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA), digerida com BamHI/BspEI, a banda de 68 bp foi purificada com gel, e clonada no sítio BamHI/BspEI do vetor pcADN6 ID/IFNaGS10-Fc, acima, para criar uma fusão IFNa Fc com um Ligante Gly/Ser de aminoácidos (3xGGGGS), pcADN6 IDIIFNa-GS15-Fc.

Exemplo 9: Clonagem de um constructo de peptídeo básico

A região gonzo do fragmento Fc de IgG1 humana de aminoácidos 221-229 (numeração EU) foi substituída com um peptídeo básico (CCB).

Quatro oligos de sobreposição foram usados (IDT, Coralville, IA):

1. CCB-Fc Sentido 1:

5' GCC GGC GAA TTC GGT GGT GAG TAC CAG GCC CTG AAG AAG AAG
GTG GCC CAG CTG AAG GCC AAG AAC CAG GCC CTG AAG AAG AAG 3'
(SEQ ID N°: 63)

2. CCB-Fc Sentido 2:

5' GTG GCC CAG CTG AAG CAC AAG GGC GGC GGC CCC GCC CCA GAG
CTC CTG GGC GGA CCG A 3' (SEQ ID N°: 64)

3. CCB-Fc Anti-Sentido 1:

5' CGG TCC GCC CAG GAG CTC TGG GGC GGG GCC GCC CTT GTG
CTT CAG CTG GGC CAC CTT CTT CAG GGC CTG GTT CTT G 3'
(SEQ ID N°: 65)

4. CCB-Fc Anti-Sentido 2:

5' GCC TTC AGC TGG GCC ACC TTC TTC nc AGG GCC TGG TAC TCA
CCA CCG AAT TCG CCG GCA 3' (SEQ ID N°: 66)

Os oligos foram reconstituídos para uma concentração de 50 μ M com dH₂O. 5 μ l de cada oligo foram anelados uns aos outros através de combinação com um tubo de PCR de parede fina com 2,2 μ l de tampão de restrição nº 2 (isto é, concentração final de 10 mM Tris HCl pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 50 mM Na Cl, 1M ditiotreitol) (New England Biolabs, Beverly, MA) e aquecidos a 95°C por 30 segundos e então deixados anelarem através de lento arrefecimento por 2 horas para 25°C. 5 pmoles dos oligos agora anelados foram ligados em um vetor pGEM T-Easy como direcionado no manual do kit (Promega, Madison, WI). A mistura de ligação foi adicionada a 50 μ l de células de *E. coli* competentes DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA) sobre gelo por 2 minutos, incubada a 37°C por 5 minutos, incubada sobre gelo por 2 minutos, e então revestida sobre placas de ágar ampicilina 100 μ l/L LB+ e colocadas a 37°C por 14 horas. Colónias bacteriais individuais foram tomadas e colocadas em 5 mL de LB+ 100 μ l/L ampicilina e deixadas crescerem por 14 horas. Os tubos foram girados em 2000xg, 4°C por 15 minutos e o ADN vetor foi isolado usando kit Qiagen miniprep (Qiagen, Valencia, CA) como indicado no manual do kit. 2 μ g de ADN foram digeridos com NgoM IVRsr-II. O fragmento foi purificado em gel com o processo Qiaquick como instruído no manual do kit (Qiagen, Valencia, CA) e ligado a pEO.dcepoFc com NgoM

IV/Rsr 11. A ligação foi transformada em células *E. coli* competentes OH5a e o ADN preparado como descrito para o vetor pGEM T-Easy.

Exemplo 10: Clonagem do constructo eritropoietina - Fc peptídeo ácido

A região gonzó do fragmento Fc de IgG1 humana em EPO-Fc de aminoácido 221-229 (numeração EU) foi substituída com um peptídeo ácido (CCA). Quatro oligos de sobreposição foram usados (IDT, Coralville, IA):

1. Epo-CCA-Fc Sentido 1:

5' CCG GTG ACA GGG AAT TCG GTG GTG AGT ACC AGG CCC TGG AGA AGG AGG TGG CCC AGC TGG AG 3' (SEQ ID N°: 67)

2. Epo-CCA-Fc Sentido 2:

5' GCC GAG AAC CAG GCC CTG GAG AAG GAG GTG GCC CAG CTG GAG CAC GAG GGT GGT CCC GCT CCA GAG CTG CTG GGC GGA CA 3'
(SEQ ID N°: 68)

3. Epo-CCA-Fc Anti-Sentido 1:

5' GTC CGC CCA GCA GCT CTG GAG CGG GAC CAC CAC CCTCGT GCT CCA GCT GGG CCA C 3' (SEQ ID N°: 69)

4. Epo-CCA-Fc Anti-Sentido 2:

5' CTC cn CTC CAG GGC CTG Gn CTC GGC CTC CAG CTG GGC CAC CTC cn CTC CAG GGC CTG GTA CTC ACC ACC GAA TTC CCT GTC ACC GGA 3' (SEQ ID N°: 70)

Os oligos foram reconstituídos para uma concentração de 50 μ M com dH₂O. 5 μ l de cada oligo foram anelados uns aos outros em um tubo de PCR de parede fina com 2,2 IJL de tampão de restrição N° 2 (New England Biolabs, Beverly, MA) e aquecidos a 95°C por 30 segundos e então deixados arrefecerem lentamente por 2 horas para 25°C. 5 pmoles dos oligos agora anelados foram ligados em um vetor pGEM T-Easy como direcionado no manual do kit (Promega, Madison, WI). A mistura de ligação foi adicionada a 50 μ l de células de *E.coli* competentes DH5a (Invitrogen, Carlsbad, CA) sobre gelo por 2 minutos, incubadas a 37°C 5 minutos, incubadas sobre gelo por 2 minutos, e então revestidas sobre placas de LB+ 100 μ g/L ampicilina ágar e colocadas a 37°C por 14 horas. Colónias bacteriais individuais foram tomadas e colocadas em 5 mL de LB+ 100 μ l/L ampicilina e deixadas crescerem por 14 horas. Os tubos foram girados em 2000xg, 4°C por 15 minutos e o ADN vetor foi preparado usando kit Qiagen miniprep (Qiagen, Valencia, CA) como indicado no manual do kit. 2 μ g de ADN foram digeridos com Age I-Rsr-II. O fragmento foi purificado através do processo Qiaquick como instruído no manual do kit (Qiagen, Valencia, CA) e ligado em pED.Epo Fc.1 Age I-Rsr 11. A ligação foi transformada em células *E. coli* competentes OH5a e ADN preparado como descrito acima.

Exemplo 11: Clonagem de constructo Cys-Fc

Usando PCR e técnicas padrões de biologia molecular (Sambrook *et al.* 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold spring Hlaboratory Press), um constructo de expressão de mamífero foi gerado de modo que a sequência codificando o peptídeo sinal IFN α humano foi diretamente limitada contra a sequência codificando Fc iniciando no primeiro resíduo cisteína (Cys 226, numeração

EU). Com clivagem de peptidase sinal e secreção a partir de células mamíferas, uma proteína Fc com um resíduo cisteína terminal-N foi assim gerada. Resumidamente, os iniciadores IFNaSig-F (IFNa-Sig-F: 5'-GCTACTGCAGCCACCATGGCCTTGACC TITGCTIT AC-3') (SEQ ID N°: 71) e Cys-Fc-R (5'-CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCGGAGAGCCCCACAGAGCAGCTTG-3') (SEQ ID N°: 72) foram usados Numa reação de PCR para criação de um fragmento ligando a sequência sinal IFNa com o término N de Fc, iniciando com Cys 226. 500 ng de pED.dc. hIFN α Δligante nativo foram adicionados a 25 pmoles de cada iniciador Numa reação PCR com Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com protocolo padrão de fabricante. A reação foi realizada em um MJ Thermocycler usando os seguintes ciclos: 94°C 2 minutos; 30 ciclos de (94°C 30 segundos, 50°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), e finalmente 72°C 10 minutos. A banda de tamanho esperado (~112 bp) foi purificada em gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA), digerida com as enzimas de restrição PstI e BspEI, purificada com gel, e subclonada nos correspondentes sítios pED.dc.hIFN α Δligante nativo para geração de pED.dc.Cys-Fc (Figura 5).

Exemplo 12: Expressão de proteína e preparação de Fc-MESNA

A sequência codificando Fc (a região constante de IgG1 humana) foi obtida por amplificação PCR a partir de um plasmídeo contendo Fc usando condições e reagentes padrões, seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante para subclonar a sequência codificando Fc NdeI/SapI. Resumidamente, os iniciadores 5'-GTGGTCATA TGGGCATTGAAGGCA-GAGGCGCCGCTGCGGTG-3' (SEQ ID N°: 73) e 5'-GGTGGTTGC TCTTCGGCAAAACCCGGAGACAGGGAGAGACTCTCTGCG-3' (SEQ ID N°: 74) foram usados para amplificar a sequência Fc a partir de 500 ng do plasmídeo pED.dC.Epo-Fc usando Expand High Fidelity

System (Boehringer Mannheim, Basel, Switzerland) em um termociclador RapidCycler (Idaho Technology, sal Lake City, Utah), desnaturando a 95°C por 2 minutos seguido por 18 ciclos de 95°C por 0 segundo. 55°C por 0 segundo, e 72°C por 1 minuto com uma inclinação de 4, seguido por extensão em 72°C por 10 minutos. O produto de PCR foi subclonado em um vetor de clonagem intermediário e inteiramente sequenciado, e então subclonado usando os sítios NdeI e Sapl no vetor pTWIN1 seguindo procedimentos padrão. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.; Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Este plasmídeo foi então transformado em células BL21 (DE3) pLySS usando processos padrões. Id. Uma cultura de 1 litro de células foi desenvolvida para uma leitura de absorbância de 0,8 AU a 37°C, induzida com isopropil beta-D-1-tiogalacto piranosídeo 1 mM, e crescia por toda a noite a 25°C. Células foram peletizadas por centrifugação, dissadas em Tris 8.8 20 mM/NP40 1% Iodoetanol de fenil metano sulfonila 0,1 mM/Benzonase 1 µg/mL (Novagen, Madison, WI), e ligadas a contas de quitina (New England Biolabs; Beverly, MA) por toda noite a 4°C. Contas foram então lavadas com vários volumes de coluna de Tris 8.5 20 mM/NaCl 500 mM/EDTA 1 mM, e então armazenadas a -80°C. Fc-MESNA purificada foi gerada por eluição de proteína a partir das contas em Tris 8.5 20 mM/NaCl 500 mM/EDTA 1 mM/ácido 2-mercaptopo etano sulfônico 500 mM (MESNA), e o eluato foi usado diretamente na reação de acoplamento, abaixo.

Exemplo 13: Expressão e purificação de híbrido monômero-dímero Fator VII-Fc

Células CHO DG-44 expressando Fator VII-Fc foram estabelecidas. Células CHO DG-44 foram desenvolvidas a

37°C, 5% CO₂, em MEM Alpha plus nucleosídeo e ribonucleosídeos e suplementado com soro bovino fetal termo inativado 5% até transfecção.

Células DG44 foram revestidas em placas de Petri de cultura de tecido de 100 mm e crescidas para uma confluência de 50%-60%. Um total de 10 µg de ADN foi usado para transfectar uma placa de 100 mm: 7,5 µg de pED.dC.FVII-Fc + 1,5 µg pcADN3/Flag-Fc + 1 µg de pcADN6-Pace. As células foram transfectadas como descrito no manual de reagente de transfecção Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Os meios foram removidos da transfecção após 48 horas e substituídos com MEM Alpha sem nucleosídeos plus soro bovino fetal dializado 5% e 10 µg/mL de Blasticidin (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 0,2 mg/mL de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após 10 dias, as células foram libertadas da placa com tripsina 0,25% e transferidas em frascos de cultura de tecido T25, e a seleção foi continuada por 10-14 dias até as células começarem a crescer bem quando linhas estáveis de células foram estabelecidas. Expressão de proteína foi subsequentemente amplificada pela adição de metotrexato 25 nM.

Aproximadamente 2 x 10⁷ células foram usadas para inocular 300 mL de meio de crescimento Numa garrafa de rolo de 1700 cm² (Coming, Coming, NY) suplementado com 5 µg/mL de vitamina K₃ (bissulfito de sódio menadiona) (Sigma, St. Louis, MO). As garrafas de rolar foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C por 72 horas. Então o meio de crescimento foi trocado com 300 mL de meio de produção livre de soro (DMEM/F12 com 5 µg/mL de insulina bovina e 10 µg/ml de Gentamicina) suplementado com 5 µg/L de vitamina K₃. O meio de produção (meio condicionado) foi coletado todo dia por 10 dias e armazenado a 4°C. Meio de produção novo foi

adicionado às garrafas de rolo após cada coleta e as garrafas foram retomadas para a incubadora. Meios reunidos foram primeiro clarificados usando um filtro de fibra de vidro Sartoclean (3,0 μ m + 0,2 μ m) (Sartorius Corp. Gottingen, Germany) seguido por um filtro Acropack 500 (0,8 μ m + 0,2 μ m) (Pall Corp., East Hills, NY). Os meios clarificados foram então concentrados aproximadamente 20 vezes usando cassetes de filtração de fluxo tangencial Pellicon Biomax (10 kDa MWCO) (Millipore Corp., Billerica, MA).

Quimeras Fc foram então capturadas a partir dos meios concentrados através de passagem sobre uma coluna de fluxo rápido de Protein A Sefarose 4 (AP Biotech, Piscataway, NJ). Uma coluna 5x5 em (100 ml) foi carregada com >5 mg proteína Fc por mL de volume de coluna Numa taxa de fluxo linear de 100 em/hora para obter um tempo de residência de \geq 3 minutos. A coluna foi então lavada com >5 volumes de coluna de 1XDPBS para remover proteínas ligadas não-especificamente. As proteínas ligadas foram eluídas com glicina 100 mM pH 3,0. Frações de eluição contendo o pico de proteína foram então neutralizadas pela adição de 1 parte de TrisHCl 1 M, pH 8 a 10 partes de fração eluída.

Para remoção de homodímeros FLAG-Fc (ou seja, dímeros Fc quiméricos com peptídeo FLAG expresso como fusões com ambas moléculas Fc) a partir de preparação, a reunião de Protein A Sefarose 4 Fast Flow foi passada sobre uma coluna de troca de cátions Unosphere S (BioRad Corp., Richmond, CA). Sob as condições de operação para a coluna, o híbrido monômero-dímero FLAG-Fc é não-carregado (FLAG-Fc teórico pI = 6,19) e flui através da coluna enquanto os constructos hFVII-Fc são carregados positivamente, e assim se ligam à coluna e eluem em maior resistência iônica. A reunião de

Protein A Sefarose 4 Fast Flow foi primeiro dializada em MES 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,1. O material dializado foi então carregado numa coluna de 1,1 x 11 em (9,9 mL) em 150 em/hora. Durante a lavagem e eluição, a taxa de fluxo foi aumentada para 500 em/hora. A coluna foi lavada sequencialmente com 8 volumes de coluna de MÊS 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,1 e 8 volumes de coluna de MES, NaCl 40 mM, pH 6,1. A proteína ligada foi eluída com MES 20 mM, NaCl 750 mM, pH 6,1. Frações de eluição contendo o pico de proteína foram reunidas e filtradas estéreis através de um disco de filtro de 0,2 µm antes de estocagem a -80°C.

Uma coluna de afinidade MAB anti-FLAG foi usada para separar dímeros Fc quiméricos com hFVII fundido a ambas moléculas Fc a partir daquelas com um peptídeo FLAG e uma fusão hFVII. A reunião Unosphere S Eluate foi diluída 1:1 com Tris 20 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 8 e carregada sobre uma coluna M2 anti-FLAG sefarose de 1,6x5 em (Sigma Corp., St. Louis, MO) Numa taxa de fluxo linear de 60 em/hora. Carga foi alvejada para <2,5 mg de híbrido monômero-dímero/mL de volume de coluna. Após carga a coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de Tris 20 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 8,0, híbridos monômero-dímero foram então eluídos com glicina 100 mM, pH 3,0. Frações de eluição contendo o pico de proteína foram então neutralizadas pela adição de 1 parte de Tris-HCl 1 M, pH 8 a 10 partes de fração de eluato. Reuniões foram armazenadas a -80°C.

Exemplo 14: Expressão e purificação de híbrido monômero-dímero e homodímero Fator IX-Fc

Células CHO DG-44 expressando Fator IX-Fc foram estabelecidas. Células DG44 foram revestidas em placas de petri de cultura de tecido de 100 mm e crescidas para uma

confluência de 50%-60%. Um total de 10 µg de ADN foi usado para transfectar uma placa de 100' mm: para a transfecção de homodímero, 8 µg de pED.dC.Fator IX-Fc + 2 µg de pcADN6PACE foram usados; para a transfecção de híbrido monômero-dímero, 8 µg de pED.dC.Fator IX-Fc + 1 µg de pcADN3-FlagFc + 1 µg de pcADN6-PACE foram usados. As células foram transfectadas como descrito no manual de reagente de transfecção Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Os meios foram removidos de transfecção após 48 horas e substituídos com MEM Alpha sem nucleosídeos plus soro bovino fetal dializado 5% e 10 µg/mL de Blasticidin (Invitrogen, Carlsbad, CA) para ambas transfecções, enquanto a transfecção de híbrido monômero-dímero também foi suplementada com 0,2 mg/mL de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após 3 dias, as células foram libertadas da placa com tripsina 0,25% e transferidas em frascos de cultura de tecido T25, e a seleção foi continuada por 10-14 dias até as células começarem a crescer bem quando linhas estáveis de células foram estabelecidas. Expressão de proteína foi subsequentemente amplificada pela adição de metotrexato 10 nM ou 100 nM para o homodímero ou híbrido monômero-dímero, respectivamente.

Para ambas linhas de células, aproximadamente 2×10^7 células foram usadas para inocular 300 mL de meio de crescimento Numa garrafa de rolo de 1700 cm² (Corning, Corning, NY), suplementado com 5 µg/L de vitamina K₃ (bissulfito de sódio menadiona) (Sigma, St. Louis, MO). As garrafas de rolo foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C por aproximadamente 72 horas. O meio de crescimento foi trocado com 300 mL de meio de produção livre de soro (DMEM/F12 com 5 µg/mL de insulina bovina e 10 µg/mL gentamicina), suplementado com 5 µg/L de vitamina K₃. O meio de produção (meio condicionado) foi coletado todo dia por 10 dias e armazenado a 4°C. Meio de

produção novo foi adicionado às garrafas de rolo após cada coleta e as garrafas foram retornadas para a incubadora. Antes de cromatografia, o meio foi clarificado usando um filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 μ m) (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI). Todas as etapas que se seguem foram realizadas a 4°C. O meio clarificado foi aplicado a Proteína A Sefarose, lavado com 5 volumes de coluna de 1XPBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, KCl 2,7 mM, e NaCl 137 mM), eluído com glicina 0,1 M, pH 2,7, e então neutralizado com 1/10 de volume de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. A proteína foi então dializada em PBS.

A amostra de proteína de transfecção híbrido monômero-dímero foi ainda submetida a purificação, na medida em que ela continha uma mistura de homodímero FIX-Fc:FIX-Fc, híbrido monômero-dímero FIX-Fc:Flag-Fc, e homodímero Flag-Fc: Flag-Fc. Material foi concentrado e aplicado a uma coluna Superdex 200 Prep Grade de 2,6 cm x 60 cm (318 mL) numa taxa de fluxo de 4 ml/minuto (36 cm/hora) e então eluída com 3 volumes de coluna de 1XPBS. Frações correspondendo a dois picos sobre o detetor UV foram coletadas e analisadas por SOS-PAGE. Frações do primeiro pico contiveram homodímero FIX-Fc:FIX-Fc ou híbrido monômero-dímero FIXFc: FlagFc, enquanto o segundo pico conteve homodímero FlagFc:FlagFc. Todas as frações contendo o híbrido monômero-dímero mas não homodímero FlagFc foram reunidas e aplicadas diretamente a uma coluna de M2 antiFLAG sefarose de 1,6x5 cm (Sigma Corp., St. Louis, MO) Numa taxa de fluxo linear de 60 cm/hora. Após carga, a coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de PBS. Híbridos monômero-dímero foram então eluídos com glicina 100 mM, pH 3,0. Frações de eluição contendo o pico de proteína foram então neutralizadas pela adição de 1/10 volume de Tris-HCl 1 M, e analisadas por SOS-PAGE redutora e não-redutora.

Frações foram dializadas em PBS, concentradas para 1-5 mg/mL, e armazenadas a -80°C.

Exemplo 15: Expressão e purificação de híbrido monômero-dímero e homodímero IFN α

Células CHO DG-44 expressando hIFN α foram estabelecidas. Células OG44 foram revestidas em placas de Petri de cultura de tecido e crescidas para confluência de 50%-60%. Um total de 10 μ g de ADN foi usado para transfectar uma placa de 100 mm: para a transfecção de homodímero, 10 μ g dos constructos hIFN α FC; para a transfecção de híbrido monômero-dímero, 8 μ g dos constructos hIFN α FC + 2 μ g de pcADN3-FlagFC. As células foram transfectadas como descrito no manual de reagente de transfecção Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Os meios foram removidos de transfecção após 48 horas e substituídos com MEM Alpha sem nucleosídeos plus soro bovino fetal dializado 5%, enquanto a transfecção de híbrido monômero-dímero também foi suplementada com geneticina 0,2 mg/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após 3 dias, as células foram libertadas da placa com tripsina 0,25% e transferidas em frascos de cultura de tecido T25, e a seleção foi continuada por 10-14 dias até as células começarem a crescer bem e linhas de células estáveis serem estabelecidas. Expressão de proteína foi subsequentemente amplificada pela adição de metotrexato: variando de 10 a 50nM.

Para todas as linhas de células, aproximadamente 2×10^7 células foram usadas para inocular 300 mL de meio de crescimento Numa garrafa de rolo de 1700 cm^2 (Coming, Coming, NY). As garrafas de rolo foram incubadas Numa atmosfera de CO₂ 5% a 37°C por aproximadamente 72 horas o Então o meio de crescimento foi trocado com 300 mL de meio

de produção livre de soro (OMEM/F12 com 5 µg/mL de insulina bovina e 10 µg/mL Gentamicina). O meio de produção (meio condicionado) foi coletado todo dia por 10 dias e armazenado a 4°C. Meio de produção novo foi adicionado às garrafas de rolo após cada coleta e as garrafas foram retomadas à incubadora. Antes de cromatografia, o meio foi clarificado usando um filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 µm) de PaU Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Todas as etapas que se seguem foram realizadas a 4°C. O meio clarificado foi a Protein A Sefarose, lavado 5 volumes de coluna de 1XPBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, KCl 2,7 mM, e NaCl 137 mM), eluído com glicina 0,1 M, pH 2,7, e então neutralizado com 1/10 volume de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. A proteína foi então dializada em PBS.

As amostras de proteína de transfecção híbrido monômero-dímero foram então submetidas a ainda purificação, na medida em que contiveram uma mistura de homodímero IFN α Fc:IFN α , híbrido monômero-dímero IFN α Fc: FlagFc, e homodímero FlagFc: FlagFc (ou Δligante ou GS15 ligante). Material foi concentrado e aplicado a uma coluna de Superdex200 Prep Grade 2,6 cm x 60 cm (318 mL) Numa taxa de fluxo de 4 ml minuto (36 cm/h) e então eluída com 3 volumes de coluna de 1XPBS. Frações correspondendo a dois picos sobre o detetor UV foram coletadas e analisadas por SOS-PAGE. Frações do primeiro pico contiveram homodímero IFN IFN α Fc Fc: IFN α Fc ou híbrido monômero-dímero IFN IFN α Fc Fc: FlagFc, enquanto o segundo pico conteve homodímero FlagFc: FlagFc. Toda as frações contendo o híbrido monômero-dímero, mas nenhuma homodímero FlagFc, foram reunidas e diretamente aplicadas a uma coluna 1,6x5 cm M2 anti-FLAG sefarose (Sigma Corp., St. Louis, MO) Numa taxa de fluxo linear de 60 cm/hora. Após carga a coluna foi lavada com 5 volumes de coluna híbridos monômero-dímero PBS

foram então eluídos com glicina 100 mM, pH 3,0. Frações de eluição contendo o pico de proteína foram então neutralizadas pela adição de 1/10 volume de Tris-HCl 1 M, e analisadas por SDS-PAGE redutora e não-redutora. Frações foram dializadas em PBS, concetradas para 1-5 mg/mL, e armazenadas a -80°C.

Exemplo 16: Expressão e purificação de proteína espiral espiralada

Os plasmídeos pED.dC Epo-CCA-Fc e pED.dC CCS-Fc serão transfetados sozinhos ou juntos Numa razão 1:1 em células CHO DG44. As células serão transfetadas como descrito no manual de reagente de transfecção Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Os meios serão removidos após 48 horas e substituídos com MEM Alpha w/o nucleosídeos plus 5% soro bovino fetal dialisado. Purificação será feita por cromatografia de afinidade sobre uma coluna de proteína A de acordo com processos conhecidos na técnica. Alternativamente, purificação pode ser obtida usando-se cromatografia de exclusão de tamanho.

Exemplo 17: Expressão e purificação de Cys-Fc

Células CHO DG-44 expressando Cys-Fc foram estabelecidas. O plasmídeo de expressão pED.dC.Cys-Fc, que contém o gene diidrofolato redutase de camundongo (dhfr), foi transfetado em células CHO DG44 (deficiente dhfr) usando reagente Superfect (Qiagen; Valencia, CA) de acordo com o protocolo do fabricante, seguido por seleção para transfetantes estáveis em meio de cultura de tecido aMEM (sem nucleosídeos) suplementado com FBS dializado 5% e antibióticos penicilina/streptomicina (Invitrogen; Carlsbad, CA) por 10 dias. A resultante reunião de células

estavelmente transfectadas foi então amplificada com metotrexato 50 nM para aumentar expressão. Aproximadamente 2×10^7 células foram usadas para inoculação de 300 mL de meio de cultura Numa garrafa de rolo de 1700cm² (Corning, Corning, NY). As garrafas de rolo foram incubadas em CO₂ 5% a 37°C por aproximadamente 72 horas. O meio de crescimento foi trocado com 300 mL de meio de produção livre de soro (DMEM/F12 com 5 µg/mL de insulina bovina e 10 µg/mL de Gentamicina). O meio de produção (meio condicionado) foi coletado todo dia por 10 dias e armazenado a 4°C. Meio de produção novo foi adicionado às garrafas de rolo após cada coleta e as garrafas foram retomadas para a incubadora. Antes de cromatografia, o meio foi clarificado usando um filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 µm) de Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Todas as etapas seguintes foram realizadas a 4°C. O meio clarificado foi aplicado a Protein A Sefarose, lavado com 5 volumes de coluna de 1XPBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, KCl 2,7 mM, e NaCl 137 mM), eluído com glicina 0,1 M, pH 2,7, e então neutralizado com 1110 volume de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. Proteína foi dializada em PBS e usada diretamente em reações de conjugação.

Exemplo 18: Acoplamento de T20-tioésteres a Cys-Fc

Cys-Fc (4 mg, 3,2 mg/mL concentração final) e T20-tioéster ou T20-PEG-tioéster (2 mg, aproximadamente 5 equivalentes molares) foram incubados por 16 horas em temperatura ambiente em Tris 0,1 8/10 mM/MESNA. Análises por SOS-PAGE (gel Tris-Gly) usando tampão de amostra redutora indicaram a presença de uma nova banda aproximadamente 5 kDa maior que o controlo Fc (>40-50% de conversão ao conjugado). Prévio sequenciamento terminal-N de Cys-Fc e Cys-Fc não reagido indicou que o peptídeo sinal é incorretamente processado Numa fração das moléculas, deixando uma mistura

de (Cys)-Fc, que reagirá através de ligação nativa com peptídeo - tioésteres, e (Val)-(Gly)-(Cys)-Fc, não reagirá. Na medida em que as condições de reação são insuficientes para interrupção de dimerização das moléculas de Cys-Fc, esta reação gerou uma mistura de homodímeros T20-Cys-Fc:T20-Cys-Fc, híbridos monômero-dímero T20-Cys-Fc:Fc, e dímeros Cys-Fc:Cys-FcFc. Esta proteína foi purificada usando cromatografia de exclusão de tamanho como indicado acima para separação de três espécies. O resultado foi confirmado por análise SOS-PAGE sob condições não redutoras.

Exemplo 19: Ensaio antiviral para atividade de IFN α

Atividade antiviral (IU/mL) de proteínas de fusão IFN α foi determinada usando um ensaio CPE (efeito citopático). Células A549 foram revestidas Numa placa de cultura de tecido de 96 cavidades em meios de crescimento (RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal 10% (FBS) e L-glutamina 2 mM) por 2 horas a 37°C, CO₂ 5%. Padrões IFN α e proteínas 90 de fusão IFN α foram diluídas em meios de crescimento e adicionados a células em triplicata por 20 horas a 37°C, 5% CO₂. Seguindo incubação, todos os meios foram removidos de cavidades, vírus de encéfalo miocardite (EMC) foi diluído em meios de crescimento e adicionados (3000 pfu/cavidade) a cada cavidade com a exceção de cavidades controles. Placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 28 horas. Células vivas foram fixadas com ácido tricloro acético frio 10% (TCA) e então manchadas com Sulforhodamine B (SRB) de acordo com protocolos publicados (Rubinstein *et al.* 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82, 1113). O corante SRB foi solubilizado com Tria 10 mM pH 10,5 e lido sobre um espectrofotômetro em 490 nm. Amostras foram analisadas através de comparação de atividades de uma curva padrão

conhecida de World Health Organization IFN α 2b International Standard variando de 5 a 0,011 IU/mL. Os resultados são apresentados abaixo na Tabela 3 e Figura 6 e demonstram aumentada atividade antiviral de híbridos monômero-dímero.

Tabela 3: Ensaio antiviral de interferon homodímero v. híbrido monômero-dímero

| Proteína | Atividade antiviral (IU/nmol) | Desvio Padrão |
|---|-------------------------------|------------------------|
| Homodímero IFNa Iigante de 8aa | 0,45x10 ⁵ | 0,29x10 ⁵ |
| IFNaFc Iigante de 8aa: híbrido monômero-dímero FlagFc | 4,5x10 ⁵ | 1,2x10 ⁵ |
| Homodímero IFNaFc Δligante | 0,22x10 ⁵ | 0,07x10 ⁵ |
| Híbrido monômero-dímero IFNaFc Δelta ligante: FlagFc | 2,4x10 ⁵ | 0,0005x10 ⁵ |
| Homodímero IFNaFc GS15 ligante | 2,3x10 ⁵ | 1,0x10 ⁵ |
| Híbrido monômero-dímero IFNaFc GS 15 ligante | 5,3x10 ⁵ | 0,15x10 ⁵ |

Exemplo 20: Análises de Atividade de Coagulação de FVIIa

O kit de ensaio StaClot FVIIa-rTF foi adquirido de Diagnóstica Stago (Parsippany, NJ) e modificado como

descrito em Johannessen et al. 2000, Blood Coagulation and Fibrinolysis 11:S159. Uma curva padrão foi pré-formada com o FVIIa World Health Organization standard 89/688. O ensaio foi usado para comparar atividade de coagulação de híbridos monômero-dímero comparados a homodímeros. Os resultados mostraram que o híbrido monômero-dímero teve quatro vezes a atividade de coagulação comparado ao homodímero (Figura 7).

Exemplo 21: Dosagem oral de FVIIa-Fc em ratos 10 dias

Ratos Sprague Dawley recém nascidos de 9 dias de 25 gramas foram adquiridos de Charles River (Wilmington, MA) e deixados em aclimatação por 24 horas. Os ratos foram dosados oralmente com homodímero 10 FVIIaFc, híbrido monômero-dímero ou uma mistura 50:50 dos dois. Um volume de 200 μ l de uma solução de FVIIaFc para uma dose de 1 mg/kg foi administrado. A solução foi composta por um tampão Tris-HCl pH 7,4 com 5 mg/mL de inibidor tripsina de soja. Os ratos sofreram eutanásia com CO₂ em vários pontos de tempo, e 200 μ l de sangue foram retirados através de perfuração cardíaca. Plasma foi obtido através da adição de solução 3,8% de citrato de sódio e centrifugação em temperatura ambiente Numa velocidade de 1268xg. As amostras de plasma foram ensaiadas frescas ou congeladas a 20°C. Híbrido monômero-dímero dosado oralmente resultou em concentrações em soro máximas (C_{max}) significantemente maiores comparadas a Fator VII homodimérico (Figura 8).

Exemplo 22: Dosagem oral de Fator IX-Fc de ratos neonatais

Ratos Sprague-Dawley neonatais foram dosados p.o. com 200 μ l de homodímero FIX-Fc ou híbrido monômero-dímero FIX-Fc:FlagFc em doses aproximadamente equimolares de 10 nmoles/kg em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5 contendo

5 mg/mL de inibidor tripsina de soja e NaCl 0,9%. Em 1, 2, 4, 8, 24, 48, e 72 horas após injeção, animais sofreram eutanásia com CO₂, sangue foi retirado via perfuração cardíaca e plasma foi obtido através da adição de uma solução 3,8% de citrato de sódio e centrifugação em temperatura ambiente Numa velocidade de 1268xg. Amostras foram então sedimentadas por centrifugação, soro coletado e congelado a 20° C até análise das proteínas de fusão por ELISA.

Exemplo 23: ELISA de Fator IX-Fc

Uma placa de ELISA Immulon 4HBX de 96 cavidades (Thermo LabSystems, Vantaa, Finland) foi revestida com 100 µl/cavidade de IgG Anti-Fator IX de cabra (Affinity Biologicals, Ancaster, Canadá) diluída 1:100 em tampão carbonato 50 mM, pH 9,6. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas ou por toda noite a 4°C seladas com filme plástico. As cavidades foram lavadas 4 vezes com PBST, 300µl/cavidade usando o lavador de placas TECAN. As cavidades foram bloqueadas com PBST + 6% BSA, 200 µl/cavidade, e incubadas 90 minutos em temperatura ambiente. As cavidades foram lavadas 4 vezes com PBST, 300 µl/cavidade usando o lavador de placas TECAN. Padrões e amostras de sangue de ratos descritas no Exemplo 18 foram adicionados às cavidades (100 µl/cavidade), e incubadas por 90 minutos em temperatura ambiente. Amostras e padrões foram diluídos em tampão HBET (HBET: 5,95 9 HEPES, 1,46 9 NaCl, 0,93 9 Na₂EDTA, 2,5 9 albumina de soro bovino, 0,25 mL Tween-20, levando para 250 mL com dH₂O, ajustar pH para 7,2). Faixa de curva padrão foi de 200 ng/mL a 0,78 ng/mL com diluições de 2 vezes entre. Cavidades foram lavadas 4 vezes com PBST, 300 µl/cavidade usando o lavador de placa TECAN. 100 µl/cavidade de anticorpo IgG-Fc-HARP anti-humano

cabra conjugado (Pierce, Rockford, IL) diluídos em HBET 1:25000 foi adicionado a cada cavidade. As placas foram incubadas 90 minutos em temperatura ambiente. As cavidades foram lavadas 4 vezes com PBST, 300 μ l/cavidade usando o lavador de placas TECAN. As placas foram desenvolvidas com 100 μ l/cavidade de substrato tetra metil benzidina peroxidase (TMB) (Pierce, Rockford, IL) adicionados de acordo com as instruções de fabricante. As placas foram incubadas 5 minutos em temperatura ambiente no escuro ou até desenvolvimento de cor. A reação foi interrompida com 100 μ l/cavidade de 2 M de ácido sulfúrico. Absorvência foi lida em 450 nm em um leitor SpectraMax plusplate (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Análises de sangue retirado em 4 horas indicaram uma diferença de mais de 10 vezes em concentração em soro entre híbridos monômero-dímero Fator IX-Fc comparados a homodímeros Fator IX Fc (Figura 9). Os resultados indicaram que níveis de híbrido monômero-dímero Fator IX-Fc foram consistentemente maiores que homodímeros Fator IX-Fc (Figura 10).

Exemplo 24: Clonagem de Epo-Fc

A região codificando Epo madura foi obtida por amplificação PCR a partir de um plasmídeo codificando a sequência codificando eritropoietina madura, originalmente obtida por RT-PCR a partir de ARNm Hep G2 e iniciadores hepoxba-F e hepoeco-R, indicados abaixo. Iniciador hepoxba-F contém um sítio XbaI, enquanto iniciador hepoeco-R contém um sítio EcoRI. PCR foi realizada no Idaho Technology RapidCycler usando Vent polimerase, desnaturando a 95°C por 15 segundos, seguido por 28 ciclos com uma inclinação de 6,0 de 95°C por 0segundo, 55°C por 0segundo, e 72°C por 1 minuto e 20 segundos, seguido por 3 minutos de extensão a 72°C. Um produto de aproximadamente 514 bp foi purificado

com gel, digerido com XbaI e EcoRI, novamente purificado com gel e subclonado direcionalmente em um vetor pED.dC.xFc purificado com gel, digerido em XbaI/EcoRI, mencionado acima. Este constructo foi chamado pED.dC.EpoFc.

A sequência Epo, contendo ambos, o peptídeo sinal endógeno e a sequência madura, foi obtida por amplificação PCR usando uma preparação de ADNC QUICK-clone de rim adulto como o molde e iniciadores Epo+Pep-Sbf-F e Epo+Pep-Sbf-R, descritos abaixo. O iniciador Epo+Pep-SbfF contém um sítio SbfI a montante do códon de partida, enquanto o iniciador Epo + Pep-Sbf-R anela à jusante do sítio SbfI endógeno na sequência Epo. A reação PCR foi realizada no PTC-200 MJ Thermocycler usando Expand polimerase, desnaturando a 94°C por 2 minutos, seguido por 32 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, e 72°C por 45 segundos, seguido por uma extensão de 10 minutos a 72°C. Um produto de aproximadamente 603 bp foi isolado com gel e subclonado no vetor pGEM-T Easy. A correta sequência codificando foi excisada através de digestão SbfI, purificada com gel, e clonada no plasmídeo pED.dC.EpoFc purificado com gel, tratado com fosfatase alcalina de camarão (SAP), digerido com PstI. O plasmídeo com a inserção na correta orientação foi inicialmente determinado através de digestão com KpnI. Uma digestão XbaI e PvuII deste constructo foram comparadas com pED.dC.EpoFc e confirmada estar na orientação correta. A sequência foi determinada e a constructo foi nomeado pED.dC.natEpoFc.

Iniciadores PCR:

hepoxba-F (EPO-F) : 5'-MTCTAGAGCCCCACCACGCCTCATCTGTGAC-3'
(SEQ ID N°: 75)

hepoeco-R (EPO-R) 5'-TTGMTTCTCTGTCCCCTGTCCCTGCAGGCC-3' (SEQ ID N°: 76)

Epo+Pep-Sbf-F: 5'-GTACCTGCAGGCGGAGATGGGGTGCA3'
(SEQ ID N°: 77) Epo+Pep-Sbf-R: 5'-CCTGGTCATCTGTCCCCTGTCC-3'
(SEQ ID N°: 78)

Exemplo 25: Clonagem de Epo-Fc

Um processo alternativo de clonagem de Epo-Fc é aqui descrito.

Iniciadores foram primeiro designados para amplificação de inteiro comprimento de sequência codificando Epo, incluindo a sequência sinal nativa, como se segue:

Epo-F: 5'-GTCCMCCTG CAGGMGCTTG CCGCCACCAT GGGAGTGCAC
GMTGTCCTG CCTGG - 3' (SEQ ID N°: 79)

Epo-R: 5'-GCCGMTTCA GTTTGTCGA CCGCAGCGG CGCCGGCGM
CTCTCTGTCC CCTGTTCTGC AGGCCTCC - 3' (SEQ ID N°: 80)

O iniciador dianteiro incorpora um sítio SbfI e HindIII à montante de uma sequência Kozak, enquanto o iniciador reverso remove o sítio SbfI interno, e adiciona um ligante de 8 aminoácidos à extremidade 3' da sequência codificante (EFAGAAAV) (SEQ ID N°: 81) assim Como sítios de restrição Sall e EcoRI. A sequência codificando Epo foi então amplificada a partir de uma biblioteca de ONAC de rim (BO Biosciences Clontech, Pala Alto, CA) usando 25 pmoles destes iniciadores Numa reação PCR de 25 µl usando Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com protocolo padrão de fabricante em um MJ Thermocycler usando os seguinte ciclos: 94°C 2 minutos; 30 ciclos de (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), seguido por 72°C por 10 minutos. A banda com

tamanho esperada (641 bp) foi purificada com gel com um Gel Extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) e ligada com o vetor de clonagem intermediário pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI). ADN foi transformado em células OH5a (Invitrogen, Carlsbad, CA) e culturas miniprep crescidas e purificadas com um Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA) ambos de acordo com protocolos padrões de fabricantes. Uma vez a sequência tenha sido confirmada, esta inserção foi digerida com enzimas de restrição SbfI/EcoRI, purificada com gel, e clonada nos sitios PstI/EcoRI do vetor de expressão mamífero pEO.dC Numa maneira similar.

Iniciadores foram designados para amplificação de sequência codificante para a região constante de IgG1 humana (a região Fc, numeração EU 221-447) como se segue:

Fc-F: 5'-GCTGCGGTCG ACAAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCCAG
CTCCGGAACT CCTGGGCGGA CCGTCAGTC- 3' (SEQ ID N°: 82) Fc-R

5'-ATTGGAATTC TCATTTACCC GGAGACAGGG AGAGGC-3' (SEQ ID N°: 83)

O iniciador dianteiro incorpora um sitio Sall na junção Ligante-Fc, assim como introduzindo sitios BspEI e RsrII na região Fc sem afetar a sequência codificante, enquanto o iniciador reverso adiciona um sitio EcoRI após o códon de interrupção. A sequência codificando Fc foi então amplificada a partir de uma biblioteca de ONAc de leucócito (BO Biosciences Clontech, Paio Alto, CA) usando 25 pmoles destes iniciadores Numa reação de PCR de 25 IJL usando Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com protocolo padrão de fabricante em um MJ Thermocycler usando os seguintes ciclos: 94°C 2 minutos; 30 ciclos de (94°C 30 segundos,

58°C e 30 segundos, 72°C 45 segundos), seguido por 72°C por 10 minutos. A banda de tamanho esperado (696 bp) foi purificada com gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA) e ligada no vetor de clonagem intermediário pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI). ADN foi transformado em células OH5a (Invitrogen, Carlsbad, CA) e culturas miniprep crescidas e purificadas com um Plasmid Miniprep Kit (Qiagenn, Valencia, CA), de acordo com protocolos do fabricante. Uma vez a sequência tenha sido confirmada, esta inserção foi digerida com enzimas de restrição SallEcoRI, purificada com gel, e clonada nos sítios SalllEcoRI do plasmídeo pED.dC.Epo (acima) Numa maneira similar, para gerar o plasmídeo de expressão mamífero pED.dC.EpoFc. Em um outro experimento este plasmídeo também foi digerido com RsrlIIXmal, e o correspondente fragmento de pSYN-Fc-002, que contém a mutação Asn 297 Ala (numeração EU) foi clonado para criar pED.dC.EPO-Fc N297A (pSYN-EPO-004). Expressão em células mamíferas foi como descrito no Exemplo 26. A sequência de aminoácidos de EpoFc com um Ligante de oito aminoácidos é provida na figura 2j. Durante o processo deste método de clonagem alternativo, embora a exata sequência de aminoácidos EpoFc tenha sido preservada (figura 2J), um número de alterações não-codificantes foi feito ao nível de nucleotídeo (figura 3J). Estes são G6A (G em nucleotídeo 6 trocado para A) (elimina possível estrutura secundária em iniciador), G567A (remove sítio Sbfl endógeno de Epo), A582G (remove sítio EcoRI de Ligante), A636T e T639G (adicionam único sítio BspEI a Fc), e G651 C (adiciona único sítio RsrlI a Fc). A sequência de nucleotídeos na figura 3J é do constructo feita no Exemplo 25, que incorpora estas diferenças a partir da sequência do constructo do Exemplo 24.

Exemplo 26: Expressão e purificação de híbrido monômero-dímero e homodímero EPO-Fc

Células DG44 foram revestidas em placas de Petri de cultura de tecido de 100 mm e crescidas para uma confluência de 50%-60%. Um total de 10 µg de ADN foi usado para transfetar uma placa de 100 mm: para a transfecção de homodímero, 10 µg de pED.dC.EPO-Fc; para a transfecção de híbrido monômero-dímero, 8 µg de pED.dC.EPO-Fc + 2 µg de pcADN3-FlagFc. Os constructos usados foram clonados como descrito no Exemplo 24. O processo de clonagem descrito no Exemplo 25 também pode ser usado para obtenção de constructos para uso neste exemplo. As células foram transfetadas como descrito no manual de reação de transfecção Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Alternativamente, PED.dC.EPO-Fc foi cotransfetado com pSYN-Fc-016 para fabricar um monômero não-marcado. Os meios foram removidos de transfecção após 48 horas e substituídos com MEM Alpha sem nucleosídeos plus soro bovino fetal dialisado para ambas transfecções, enquanto a transfecção de híbrido monômero-dímero também foi suplementada com 0,2 mg/mL de geneticina (Invitrogen, Carlsbad. CA). Após 3 dias, as células foram libertadas da placa com tripsina 0,25% e transferidas em frascos de cultura de tecido T25, e a seleção foi continuada por 10-14 dias até as células começarem a crescer bem quando linhas de células estáveis foram estabelecidas. Expressão de proteína foi subsequentemente amplificada pela adição de metotrexato.

Para ambas linhas de células, aproximadamente 2×10^7 células foram usadas para inocular 300 mL de meio de crescimento Numa garrafa de rolo de 1700 cm² (Corning, Corning, NY). As garrafas de rolo foram incubadas em CO₂ 5% a 37°C por aproximadamente 72 horas. O meio de crescimento foi trocado

com 300 mL de meio de produção livre de soro (DMEM/F12 com 5 µg/ml de insulina bovina e 10 µg/ml Gentamicina). O meio de produção (meio condicionado) foi coletado todo dia por 10 dias e armazenado a 4°C. Meio de produção novo foi adicionado às garrafas de rolo após cada coleta e as garrafas foram retornadas para a incubadora. Antes de cromatografia, o meio foi clarificado usando um filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 µm) de Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Todas as etapas seguintes foram realizadas a 4°C. O meio clarificado foi aplicado a Protein A Sefarose, lavado com 5 volumes de coluna de 1X PBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, KC12,7 mM, e NaCl 137 mM), eluído com glicina 0,1 M, pH 2,7, e então neutralizado com 1/10 volume de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. Proteína foi então dialisada em PBS.

A amostra de proteína de transfecção híbrido monômero-dímero foi submetida ainda a purificação, na medida em que ela conteve uma mistura de homodímero EPO-Fc:EPO-Fc, híbrido monômero-dímero EPO-Fc:Flag-Fc, e homodímero Flag-Fc:Flag-Fc. Material foi concentrado e aplicado a uma coluna Superdex 200 Prep Grade de 2,6 cm x 60 cm (318 mL) Numa taxa de fluxo de 4 mL/minuto (36 cm/hora) e então eluída com 3 volumes de coluna de 1X PBS. Frações correspondendo a dois picos sobre o detetor de UV foram coletadas e analisadas por SOS-PAGE. Frações do primeiro pico contiveram tanto homodímero EPO-Fc:EPO-Fc como híbrido monômero-dímero EPO-FC:FlagFc, enquanto o segundo pico conteve homodímero FlagFc:FlagFc. Todas as frações contendo o híbrido monômero-dímero mas não homodímero FalgFc foram reunidas e diretamente aplicadas a uma coluna M2 anti-FLAG sefarose de 1,6 x 5 em (Sigma Corp.) Numa taxa de fluxo linear de 60 em/hora. Após carga a coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de PBS. Híbridos monômero-dímero foram então eluídos com glicina 100 mM, pH 3,0. Frações de

eluição contendo o pico de proteína foram então neutralizadas pela adição de 1/10 de volume de TrisHCl 1M, e analisadas por SOS-PAGE redutora e não-redutora. Frações foram dialisadas em PBS, concentradas para 1-5 mg/mL, e armazenadas em -80°C.

Alternativamente, frações do primeiro pico da Superdex 200 foram analisadas por SOS-PAGE, e somente frações contendo uma maioria de híbrido monômero-dímero EpoFc, com uma minoria de homodímero EpoFc, foram reunidas. Esta reunião, enriquecida em híbrido monômero-dímero, foi então reaplicada a uma coluna Superdex 200, e frações contendo somente híbrido monômero-dímero EpoFc foram então reunidas, dialisadas e armazenadas como proteína purificada. Notar que este processo de purificação alternativo também pode ser usado para purificar híbridos monômero-dímero não-marcadores.

Exemplo 27: Administração de híbrido monômero-dímero e dímero EpoFc com um Ligante de oito aminoácidos a macacos Cynomolgus

Para administração pulmonar, aerossóis de proteínas dímero EpoFc ou híbrido monômero-dímero EpoFc (ambas com o Ligante de 8 aminoácidos) em PBS, pH 7,4 foram criadas com o nebulizador Aeroneb Pro™ (AeroGen, Mountain View, CA), em linha com um respirador Bird Mark 7A, e administrados a macacos cynomolgus simples anestesiado através de tubos endotraqueais (aproximando respiração tidal normal). Ambas proteínas também foram administradas a macacos cynomolgus simples através de injeção intravenosa. Amostras foram tomadas em vários pontos de tempo, e a quantidade de proteína contendo-Epo no resultante plasma foi determinada usando o Quantikine IVO Human Epo Immunoassay (R & O

Systems, Minneapolis, MN). Parâmetros fármaco-cinéticos foram calculados usando o software WinNonLin. A Tabela 4 apresenta os resultados de biodisponibilidade de macacos cynomolgus tratados com híbrido monômero-dímero EpoFc ou dímero EpoFc.

TABELA 4: ADMINISTRAÇÃO DE HÍBRIDO MONÔMERO-DÍMERO EPOFC E DÍMERO EPOFC A MACACOS

| Proteína | Macaco # | Via | Dose ¹ Depositada Aproximada (µg/kg) | C _{max} (ng/ml) | C _{max} (fmol/ml) | t _{1/2} (h) | t _{1/2} avg (h) |
|-------------------------------|----------|------|---|--------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------|
| Híbrido monômero-dímero EpoFc | C06181 | pulm | 20 | 72,3 | 1014 | 23,6 | 25,2 |
| | C06214 | pulm | 20 | 50,1 | 703 | 23,5 | |
| | C07300 | pulm | 20 | 120 | 1684 | 36,2 | |
| | C07332 | pulm | 20 | 100 | 1403 | 17,5 | |
| | C07285 | IV | 25 | 749 | 10508 | 21,3 | 22,6 |
| | C07288 | IV | 25 | 566 | 7941 | 23 | |
| | C07343 | IV | 25 | 551 | 1014 | 23,5 | |
| Dímero EpoFc | 00026 | pulm | 15 | 10,7 | 120 | 11,5 | 22,1 |
| | 00062 | pulm | 15 | 21,8 | 244 | 27,3 | |
| | 00046 | pulm | 15 | 6,4 | 72 | 21,8 | |
| | 00015 | pulm | 15 | 12,8 | 143 | 20,9 | |
| | 00038 | pulm | 35 | 27 | 302 | 29 | |
| | F4921 | IV | 150 | 3701 | 41454 | 15,1 | 14,6 |
| | 96Z002 | IV | 150 | 3680 | 41219 | 15,3 | |
| | 1261CQ | IV | 150 | 2726 | 30533 | 23,6 | |
| | 127-107 | IV | 150 | 4230 | 47379 | 15,0 | |
| | 118-22 | IV | 150 | 4500 | 50403 | 8,7 | |
| | 126-60 | IV | 150 | 3531 | 39550 | 9,8 | |

¹ Baseado em fração de deposição de 15% de dose nebulizada como determinado por cintigrafia gama.

A percentagem de biodisponibilidade (F) foi calculada para as doses pulmonares usando a seguinte equação:

$$F = (\text{AUC pulmonar}/\text{dose pulmonar}) / (\text{AUC IV}/\text{Dose IV}) * 100$$

TABELA 5: CÁLCULO DE PERCENTAGEM DE BIODISPONIBILIDADE PARA HÍBRIDO MONÔMERO-DÍMERO EPOFC V. DÍMERO APÓS ADMINISTRAÇÃO PULMONAR A MACACOS CYNOMOLGUS SIMPLES

| Proteína | Macaco # | Dose Aproximada (depositada) | AUC ng.h/mL | Biodisponibilidade ² (%) | Biodisponibilidade Média |
|-------------------------------|----------|------------------------------|-------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Híbrido monômero-dímero EpoFc | C06181 | 20 µg/kg | 3810 | 25,2% | 34,9% |
| | C06214 | 20 µg/kg | 3072 | 20,3% | |
| | C07300 | 20 µg/kg | 9525 | 63,0% | |
| | C07332 | 20 µg/kg | 4708 | 31,1% | |
| Dímero EpoFc | 00026 | 15 µg/kg | 361 | 5,1% | 10,0% |
| | 00062 | 15 µg/kg | 1392 | 19,6% | |
| | 00046 | 15 µg/kg | 267 | 3,8% | |
| | 00015 | 15 µg/kg | 647 | 9,1% | |
| | 00038 | 35 µg/kg | 2062 | 12,4% | |

¹ baseado em fração de deposição de 15% de dose nebulizada como determinado por cintigrafia gama.

² média AUC para híbrido monômero-dímero IV EpoFc = 18.913 ng.h/mL (n=3 macacos), dosado em 25 µg/kg. Média AUC para dímero IV EpoFc = 70,967 ng.h/mL (n=6 macacos), dosado em 150 µg/kg.

As fármaco-cinéticas de EpoFc com um ligante de 8 aminoácido administrado a macacos cynomolgus são apresentadas na figura 11. A figura compara o dímero EpoFc com o híbrido monômero-dímero EpoFc em macacos após administração de uma dose pulmonar simples. Baseado Numa

comparação molar níveis em soro significativamente maiores foram obtidos em macacos tratados como híbrido monômero-dímero comparado ao dímero.

Exemplo 28: Administração subcutânea de híbrido monômero-dímero EPOFc

Para comparar concentrações em soro de conhecidos agentes eritropoietina com híbridos monômero-dímero EPOFc, ambos híbrido monômero-dímero EPOFc e Aranesp™ (darbepoetin alfa), que não é uma proteína de fusão quimérica, foram administrados subcutaneamente a diferentes macacos e a concentração em soro de ambos foi medida com o tempo.

Macacos cynomolgus (n=3 por grupo) foram injetados subcutaneamente com 0,025 mg/kg de híbrido monômero-dímero EpoFc. Amostras de sangue foram coletadas pré-dose e em momentos até 144 horas após dose. Soro foi preparado a partir de sangue e armazenado congelado até análises por ELISA (Human Epo Quantikine Immunoassay) (R & D Systems, Minneapolis, MN). Parâmetros fármaco-cinéticos foram determinados usando software WinNonLina (Pharsight, Mountainview, CA).

Os resultados indicaram que as concentrações de soro de ambos, híbrido monômero-dímero EPOFc e Aranesp (darbepoetin a) foram equivalentes com o tempo, embora a dose molar administrada de Aranesp (darbepoetin a) tenha sido levemente maior (Tabela 6) (figura 12).

TABELA 6

| | Via | Dose (μ g/k g) | Dose (nmol/ kg) | C_{max} (ng/m L) | AUC (ng·hr· mL ⁻¹) | $T_{1/2}$ (h) | % Biodispo ni- |
|--|-----|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------------|------------------|----------------------|
| | | | | | | | |

| | | | | | | | bilidade (F) |
|-------------------------------|------------|----|------|--------|--------------|------|-----------------|
| Híbrido monômero-dímero EpoFc | Subcutânea | 25 | 0,3 | 133±34 | 10,745±3,144 | 26±5 | 57±17 |
| Aranesp™ | Subcutânea | 20 | 0,54 | 83±11 | 5390 ± 747 | 22±2 | 53±8 |

Exemplo 29: Administração intravenosa de híbrido monômero-dímero EPOFc

Para comparar concentrações em soro de conhecidos agentes eritropoietina com híbridos monômero-dímero EPOFc, híbrido monômero-dímero EPOFc, Aranesp™ (dabepoetin alfa), e Epogen™ (epoetin alfa), nenhum dos quais é uma proteína de fusão quimérica, foram administrados intravenosamente a diferentes macacos e a concentração em soro de ambos foi medida com o tempo.

Macacos cynomolgus (n=3 por grupo) foram injetados intravenosamente com 0,025 mg/kg de híbrido monômero-dímero EpoFc. Amostras de sangue foram coletadas pré-dose e em tempos de até 144 horas após dose. Soro foi preparado a partir de sangue e armazenado congelado até análise por ELISA (Human Epo Quantikine Immunoassay) (R&D Systems, Minneapolis, MN). Parâmetros fármaco - cinéticos foram determinados usando software WinNonLina (Pharsight, Mountainview, CA).

Os resultados indicaram que a concentração em soro versus tempo (AUC) de híbrido monômero-dímero EPOFc foi maior que

as concentrações de Epogen (epoetin a) ou Aranesp (darbepoetin alfa), embora os macacos tenham recebido maiores doses molares de ambos Epogen (epoetin alfa) e Aranesp (darbepoetil a) (Tabela 7) (Figura 13).

TABELA 7

| | Via | Dose (μ g/kg) | Dose (nmol/kg) | Cmax (ng/mL) | AUC (ng·hr·mL ⁻¹) | T _{1/2} (h) |
|---|-------------|-----------------------|-------------------|-----------------|----------------------------------|-------------------------|
| Híbrido Monômero- dímero EpoFc | Intravenosa | 25 | 0,3 | 622±110 | 18,913± 3,022 | 23±1 |
| Aranesp™ | Intravenosa | 20 | 0,54 | 521±8 | 10,219± 298 | 20±1 |
| Epogen | Intravenosa | 20 | 0,66 | 514±172 | 3936±636 | 6,3±0,6 |

Exemplo 30: Purificação alternativa de híbrido monômero-dímero EpoFc

Ainda uma outra alternativa para purificação de EPO-Fc é aqui descrita. Uma mistura contendo Fc, híbrido monômero-dímero e dímero EpoFc foi aplicada a uma coluna de Proteína A Sefarose (Amersham, Uppsala, Sweden). A mistura foi eluída de acordo com as instruções do fabricante. O eluado de Proteína A Sefarose, contendo a mistura foi trocada com tampão em Tris-Cl 50 mM (pH 8,0). A mistura de proteínas foi carregada sobre uma coluna Mimetic Red 2 XL de 8mL (ProMetic Life Sciences, Inc., Wayne, NJ) que foi equilibrada com Tris-Cl 50 mM (pH 8,0). A coluna foi então lavada com Tris-Cl 50 mM (pH 8,0); NaCl 50 mM. Esta etapa removeu maior parte de Fc. Híbrido monômero-dímero EpoFc foi especificamente eluído da coluna com Tris-Cl 50 mM (pH 8,0); NaCl 400 mM. Dímeros EpoFc pode ser eluído e a coluna regenerada com 5 volumes de coluna de NaOH 1 M. Frações eluídas da coluna foram analisadas por SOS-PAGE (Figura 14).

Exemplo 31: Clonagem de constructo Fc - sequência sinal Igκ para fabrico de FC não-marcada sozinha

A sequência codificando a região constante de IgG1 (EU# 221-447; a região Fc) foi obtida por amplificação PCR a partir de uma biblioteca de ONAc de leucócito (Clontech, CA) usando os seguintes iniciadores:

rcFc-F 5' - GCTCGGGTCGACAAAAACTCACACATGCCACCAGCTCC GGAACTCCTGGGCGGACCGTCAGTC -3' (SEQ ID N°: 84)

rcFc-R 5' - ATTGGAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC -3' (SEQ ID N°: 85)

O iniciador para frente adiciona três aminoácidos (AAV) e um sítio de clonagem Sall antes de início da região Fc, e também incorpora um sítio de restrição BspEI em aminoácidos 231-233 e um sítio de restrição Rsrl1 em aminoácidos 236-238 usando a degenerescência do código genético para preservar a correta sequência de aminoácidos (numeração EU). O iniciador reverso adiciona um sítio de clonagem EcoRI após o códon de interrupção da Fc. Uma reação PCR de 25 µl foi realizada com 25 pmoles de cada iniciador usando Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com protocolo padrão de fabricante em um MJ Thermocycler usando os seguintes ciclos: 94°C 2 minutos; 30 ciclos de (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), 72°C 10 minutos. A banda de tamanho esperado (-696 bp) foi purificada com gel com um kit de Extração de Gel (Qiagen, Valencia, CA), e clonada em pGEM T-Easy (Pro-mega, Madison, WI) para produzir um plasmídeo intermediário pSYN-Fc-001 (pGEM T-Easy/Fc).

A sequência sinal Igκ de camundongo foi adicionada à Fc CDS usando os seguintes iniciadores:

rc-lgK sig seq-F: 5'-TTAAGCTTGCAGCCACCATGGAGACAG
ACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACAAACT
CACACATGCCACCG -3' (SEQ ID N°: 86)
Fc-noXma-GS-R: 5'- GGTCAAGCTCATCGCGGGATGGG -3' (SEQ ID N°:
87)
Fc-noXma-GS-F: 5'- CCCATCCCGCGATGAGCTGACC -3' (SEQ ID N°:
88)

O iniciador F-sequência sinal rc-Igκ adiciona um sítio de restrição Hindlll à extremidade 5' da molécula, seguida por uma sequência Kozak (GCCGCCACC) (SEQ ID N°: 89) seguida pela sequência sinal da cadeia leve Igκ de camundongo, diretamente limitada ao início da sequência Fc (EU# 221). Os iniciadores Fc-noXma-GS-F e -R removem o sítio XmaI interno da sequência codificando Fc, usando a degenerescência do código genético para preservar a correta sequência de aminoácidos. Duas reações PCR de 25μl foram realizadas com 25 pmoles de F-sequência sinal rc-Igκ e FcnoXma-GS-R ou Fc-noXma-GS-F e rcFc-R usando Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com o protocolo padrão do fabricante em um MJ Thermocycler. A primeira reação foi realizada com 500 ng de biblioteca de ONAc de leucócito (BO Biosciences Clontech, Paio Alto, CA) como um molde usando os seguintes ciclos: 94°C 2 minutos; ciclos de (94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), 72°C 10 minutos. A segunda reação foi realizada com 500 ng de pSYN-Fc001 como um molde (acima) usando os seguintes ciclos: 94°C 2 minutos; 16 ciclos de (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), 72°C 10 minutos. As bandas de tamanho esperado (-495 e 299 bp, respectivamente) foram purificadas com gel com um kit GelExtraction (Qiagen, Valencia, CA), então combinadas Numa reação PCR com 25 pmoles de iniciadores F-sequência sinalrc-Igκ e rcFc-R e corridas como antes,

anelando a 58°C e continuando por 16 ciclos. A banda de tamanho esperado (~772 bp) foi purificada com gel em um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA) e clonada em pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) para produzir um plasmídeo intermediário pSYN-Fc-007 (pGEM T-Easy/Igκ sig seq-Fc). O cassette Fc sequência sinal Igκ inteiro foi então subclonado usando os sítios HindIII e EcoRI no vetor de expressão em mamífero pEE6.4 (Lonza, Slough, UK) ou pcADN3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), dependendo do sistema a ser usado, para gerar pSYN-Fc-009 (pEE6.4/lgκ sig seq-Fc) e pSYN-Fc-015 (pcADN 3/lgκ sig seq-Fc).

Exemplo 32: Clonagem de constructo sequência sinal Igκ - Fc N297A para fabricação de Fc N297A não-marcada sozinha

De modo a realizar mutação de Asn 297 (numeração EU) de Fc para um resíduo Ala, os seguintes iniciadores foram usados:
N297A-F 5'- - GAGCAGTACGCTAGCACGTACCG -3' (SEQ ID N°: 90)

N297A-R 5'- - GGTACGTGCTAGCGTACTGCTCC -3' (SEQ ID N°: 91)

Duas reações PCR foram realizadas com 25 pmoles de sequência sinal rc-Igκ - F e N297A-R ou N297A-F e rcFc-R usando Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com o protocolo padrão de fabricante em um MJ Thermocycler. Ambas reações foram realizadas usando 500 ng de pSYN-Fc-007 como um molde usando os seguintes ciclos: 94°C 2 minutos; 16 ciclos de (94°C 30 segundos, 48°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), 72°C 10 minutos. As bandas de tamanho esperado (~319 e 475 bp, respectivamente) foram purificadas com gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA), então combinadas. Numa reação PCR com 25 pmoles de iniciadores sequência sinal rc-Igκ - F e rcFc-R e corridas como antes, anelando a

58°C e continuando por 16 ciclos. A banda de tamanho esperado (~772 bp) foi purificada com gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA) e clonada em pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) para produzir um plasmídeo intermediário pSYN-Fc-008 (pGEM T-Easy/lgκ sig seq-Fc N297A). Toda a cassette sozinha de sequência sinal lgκ - Fc foi então subclonada usando os sítios HindIII e EcoRI no vetor de expressão mamífero pEE6.4' (Lonza, Slough, UK) ou pcADN3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), dependendo do sistema a ser usado, para gerar pSYN-Fc-016 (pEE6.4/lgκ sig seq-Fc N297A) e pSYN-Fc-016 (pcADN3/lgκ sig seq-Fc N297A).

Estes mesmos iniciadores N297A também foram usados com iniciadores rcFc-F e rcFc-R e pSYN-Fc-001 como um molde Numa reação PCR seguida por subclonagem como indicado acima para gerar pSYN-Fc107 002 (pGEM T-Easy/Fc N297A).

Exemplo 33: Clonagem de EpoFc e Fc em plasmídeo simples para vetores de gene duplo para fabricação de EpoFc tipo selvagem ou híbridos monômero-dímero N297A e expressão.

Uma alternativa para transfecção de constructos EpoFc e Fc sobre plasmídeos separados é clonar as mesmas num plasmídeo simples, também chamado um vetor de gene duplo, tal como usado no sistema Lonza Biologics (Slough, UK). O fragmento RsrII/EcoRI de pSYN-Fc-002 foi subclonado nos correspondentes sítios em pEE12.4 (Lonza Biologics, Slough, UK) de acordo com procedimentos padrões para gerar pSYN-Fc-006 (fragmento pEE12.4/Fc N297A). O plasmídeo pSYN-EPO-004 foi usado como um molde para reação PCR usando iniciador Epo-F de Exemplo 25 e o seguinte iniciador:

EpoRsr-R: 5' - CTGACGGTCCGCCAGGAGTTCCGGAGCTGG
GCACGGTGGGCATG TGTGAGTTTGTGACCGCAGCGG -3' (SEO ID N°: 91)

Uma reação PCR foi realizada usando Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com protocolo padrão de fabricante em um MJ Thermocycler como indicado acima, por 16 ciclos com 55°C de temperatura de anelamento. A banda de tamanho esperado (~689 bp) foi purificada com gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA) e clonada em pSYN-EPO-005 (pEE12.4/EpoFc N297A). O vetor gene duplo para o híbrido monômero-dímero EpoFc N297A foi então construído através de clonagem de fragmento NotI/BamHI de pSYN-Fc-010 nos correspondentes sítios em pSYN-Fc-006 usando os sítios de restrição HindIII/RsrII, pSYN-EPO-005 para gerar pSYN-EPO-008 (pEE12.4-6.4/EpoFc N297A1Fc N297A).

O constructo tipo selvagem também foi fabricado por subclonagem de sequência Fc tipo selvagem de pSYN-Fc-001 em pSYN-EPO-005 usando os sítios RsrII e EcoRI, para gerar pSYN-EPO-006 (pEE12.4/EpoFc). O vetor gene duplo para o híbrido monômero-dímero EpoFc foi então construído através de clonagem de fragmento NotI/BamHI a partir de pSYN-Fc-009 nos m correspondentes sítios em pSYN-EPO-006 para gerar pSYN-EPO-007 (pEE12.4-6.4/EpoFc/Fc).

Cada plasmídeo foi transfetado em células CHOK1 SV e clones positivos identificados e adaptados para suspensão livre de soro, como indicado em Lonza Biologics Manual for Standard Operating procedures (Lonza Biologics, Slough, UK), e purificado como indicado para outros constructos de monômero-dímero.

Exemplo 34: Clonagem de IFN β Fc humana. IFN β -Fc N297A com ligantes de oito aminoácidos e constructos lgk-Fc-6His

10 ng de uma biblioteca de ADN genómico humano de Clontech (BD Biosciences Clontech, Paio Alto, CA) foram usados como um molde para isolar IFN β humano com sua sequência sinal nativa usando os seguintes iniciadores:

IFN β p-F H3/Sbfl:

5'-CTAGCCTGCAGGAAGCTTGCCGCCACCATGACCA

ACAAGTGTCTCCTC -3' (SEQ ID N°: 92)

IFN β -R (EFAG) Sal: 5'- TTTGTCGACCGCAGCGGCCGGCG

AACTCGTTCGGAGGTAACCTGTAAG -3' (SEQ ID N°: 93)

O iniciador reverso também foi usado para criar uma sequência ligadora de oito aminoácidos (EFAGAAAV) (SEQ ID N°: 94) sobre a extremidade 3' da sequência IFN β humana. A reação PCR foi realizada usando Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com protocolo padrão de fabricante em um Rapid Cycler Thermocycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT). Um produto de PCR do tamanho correto (~607 bp) foi purificado com gel usando um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA), clonado em um vetor de clonagem TA (Promega, Madison, WI) e sequenciado. Este constructo foi nomeado pSYN-IFN β -002. pSYN-IFN β -002 foi digerida com Sbfl e Sall e clonada em pSP72 (Promega) em sítios PstI e Sall para render pSYN-IFN β -005.

pSYN-Fc-001 purificada (0,6 μ g) foi digerida com Sall e EcoRI e clonada nos correspondentes sítios de pSYN-IFN β -005 para criar o plasmídeo pSYN-IFN β -006 que contém IFN β humano ligado a Fc humana através de uma sequência ligadora de oito aminoácidos. pSYN-IFN β -006 foi então digerida com Sbfl e EcoRI e a sequência IFN β -Fc de inteiro comprimento

cionada nos sítios PstI e EcoRI de pEDdC.sig para criar plasmídeo pSYNIFN β -008.

pSYN-Fc-002 contendo Fc ADN humano com uma alteração de aminoácido simples de asparagina para alanina na posição 297 (N297A; numeração EU) foi digerido com BspEI e XmaI para isolar um fragmento de ADN de ~365 bp contendo a mutação N297A. Este fragmento de ADN foi克lonado nos correspondentes sítios em pSYN-IFN β -008 para criar plasmídeo pSYN-IFN β -009 que contém a sequência IFN β -Fc com um ligante de oito aminoácidos e uma mutação N297A em Fc no vetor de expressão, pED.dC.

Clonagem de sequência sinal Ig κ - Fc N297A-6His. Os seguintes iniciadores foram usados para adicionar um marcador 6xHis ao término C da sequência codificando Fc N297A:

Fc GS-F: 5'- GGCAAGCTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCC -3' (SEO ID N°: 95)

FC.6His-R: 5'- TCAGTGGTGATGGTGATGATGTTIACCCGGAGACAGGGAG -3' (SEO ID N°: 96)

Fc.6His-F: 5' - GGTAAACATCATCACCATCACCACTGAGAATTCCAA TATCACTAGTGAATICG -3' (SEO ID N°: 97)

Sp6+T-R: 5'- GCTATTIAGGTGACACTATAGAATACTCAAGC -3' (SEO ID N°: 98)

Duas reações PCR foram realizadas com 50 pmoles de Fc GS-F e Fc.6His-R ou Fc.6His-F e Sp6+T-R usando o Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acordo com protocolo padrão de fabricante em um MJ

Thermocycler. Ambas reações foram realizadas usando 500 ng de pSYN-Fc-008 como um molde Numa reação de 50 µl, usando condições de ciclização padrões. As bandas de tamanho esperado (-780 e 138 bp, respectivamente) foram purificadas com gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA), então combinadas Numa reação PCR de 50 µl com 50 pmoles de iniciadores Fc GS-F e Sp6+T-R e corridas como antes, usando condições de ciclização padrões. A banda de tamanho esperado (-891 bp) foi purificada com gel com um kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA) e clonado em pCADN6 V5-His B usando os sítios HindIII e EcoRI para gerar pSYN-Fc-014 (pCADN6/lgk sig seq-Fc N297A-6His).

Exemplo 35: Expressão e purificação de IFN β Fc. homodímero IFN β -Fc N297A e híbrido monômero-dímero IFN β -Fc N297A

Células CHO DG44 foram revestidas em placas de cultura de tecido de 100 mm e crescidas para uma confluência de 50%-60%. Um total de 10 µl de ADN foi usado para transfectar uma simples placa de 100 mm. Para a transfecção de homodímero, 10 µl do constructo pSYN-FNp-008 ou pSYN-IFN β -009 foram usados; para a transfecção de híbrido monômero-dímero, 8 µl do constructo pSYN-IFN β -009 + 2 µl de pSYN-Fc-014 foram usados. As células foram transfectadas usando reagentes de transfecção Superfect (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com instruções do fabricante 48 a 72 horas após transfecção, meio de crescimento foi removido e as células foram libertadas das placas com tripsina 0,25% e transferidas para frascos de cultura de tecido T75 em meio de seleção MEM Alpha sem nucleosídeos plus soro bovino fetal dializado 5%). O meio de seleção para a transfecção de híbrido monômero-dímero foi suplementado com 5 µl/mL de Blasticidin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Seleção foi continuada por 10-14 dias até as células começarem a

crescer bem e linhas de células estáveis foram estabelecidas. Expressão de proteína foi subsequentemente amplificada pela adição de metotrexato: variando de 10 a 50 nM.

Para todas as linhas de células, aproximadamente 2×10^7 células foram usadas para inocular 300 mL de meio de crescimento Numa garrafa de rolo de 1700 cm² (Corning, Corning, NY). As garrafas de rolo foram incubadas Numa incubadora de CO₂ 5% a 37°C por aproximadamente 72 horas. O meio de crescimento foi então trocado com 300 mL de meio de produção livre de soro (DMEM/F12 com 5 µl/mL de insulina humana). O meio de produção (meio condicionado) foi coletado cada dia por 10 dias e armazenado a 4°C. Meio de produção novo foi adicionado às garrafas de rolo após cada coleta e as garrafas foram retornadas para a incubadora. Antes de cromatografia, o meio foi clarificado usando um filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 µm) de Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Todas as etapas seguintes foram realizadas a 4°C. O meio clarificado foi aplicado a Proteína A Sefarose, lavado com 5 volumes de coluna de 1X PBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, KCl 2,7 mM e NaCl 137 mM), eluído com glicina 0,1 M, pH 2,7, e então neutralizado com 1/10 volume de Tris-HCl 1 M pH 8,0, NaCl 5 M. As proteínas homodímero foram ainda purificadas sobre uma coluna Superdex 200 Prep Grade sizing corridas e eluídas em fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol 10%.

A proteína híbrido monômero-dímero foi submetida a ainda purificação uma vez que ela conteve uma mistura de homodímero IFNβFc N297A:IFNβFc N297A, híbrido monômero-dímero IFNβFc N297A:Fc N297A His, e homodímero Fc N297A His:Fc N297A His. Material foi aplicado a uma coluna quelante de níquel em fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, NaCl

500 mM. Após carga, a coluna foi lavada com imidazol 50 mM em fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM e proteína foi eluída com um gradiente de imidazol 50-500 mM em fosfato de sódio 50- mM pH 7,5, NaCl 500 mM. Frações correspondendo a picos de eluição sobre um detector UV foram coletadas e analisadas por SOS-PAGE. Frações do primeiro pico contiveram híbrido monômero-dímero IFN β Fc N297A:Fc N297A His, enquanto o segundo pico conteve homodímero Fc N297A His:Fc N297A His. Todas as frações contendo o híbrido monômero-dímero, mas nenhum homodímero Fc, foram reunidas e aplicadas diretamente a uma coluna Superdex 200 Prep Grade sizing, corridas e eluídas em fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol 10%. Frações contendo híbridos monômero-dímero IFN β -Fc N297A:Fc N297A His foram reunidas e armazenadas em -80°C.

Exemplo 36: Ensaio antiviral para atividade IFN β

Atividade antiviral (IU/mL) de proteínas de fusão IFN β foi determinada usando um ensaio CPE (efeito citopático). Células A549 foram revestidas Numa placa de cultura de tecido de 96 cavidades em meios de crescimento (RPMI suplementado com soro bovino fetal 10% (FBS) e L-30 glutamina 2 mM) por 2 horas a 37°C, CO₂ 5%. Padrões IFNB e proteínas de fusão IFN β foram diluídos em meios de crescimento e adicionados a células em triplicata por 20 horas a 37°C, CO₂ 5%. Seguindo incubação, todos os meios foram removidos de cavidades, vírus de encéfalomiocardite (EMCV) foi diluído em meios de crescimento e adicionados (3000 pfu/cavidade) a cada cavidade com a exceção de cavidades controlos. Placas foram incubadas a 37°C, CO₂ 5% por 28 horas. Células vivas foram fixadas com ácido tricloro acético (TCA) frio 10% e então manchadas com sulforodamina B (SRB) de acordo com protocolos publicados

(Rubinstein *et al.* 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1113). O corante SRB foi solubilizado com Tris 10 mM pH 10,5 e lido sobre um espectrofotômetro em 490 nm. Amostras foram analisadas através de comparação de atividades a uma curva padrão conhecida variando de 10 a 0,199 IU/mL. Os resultados são apresentados abaixo na Tabela 8 e demonstram aumentada atividade antiviral de híbridos monômero-dímero.

TABELA 8: ENSAIO ANTIVIRAL INTERFERON B
HOMODÍMERO V. HÍBRIDO MONÔMERO-DÍMERO

| Protéina | Atividade antiviral (IU/nmol) | Desvio padrão |
|---|-------------------------------|--------------------|
| Homodímero IFN β -Fc ligante 8aa | $4,5 \times 10^5$ | $0,72 \times 10^5$ |
| Homodímero IFN β Fc N297A ligante de 8aa | $3,21 \times 10^5$ | $0,48 \times 10^5$ |
| Híbrido monômero-dímero IFN β Fc N297A ligante de 8aa: Fc His | $12,2 \times 10^5$ | 2×10^5 |

Exemplo 37: Administração de homodímero IFN β Fc e híbrido monômero-dímero com um Ligante de oito aminoácidos a macacos cynomolgus

Para administração pulmonar, aerossóis de proteínas homodímero IFN β Fc ou híbrido monômero-dímero IFN β Fc N297A (ambas com o Ligante de 8 aminoácidos) em PBS, pH 7,4, HSA 0,25% foram criados com o nebulizador Aeroneb ProTM (AeroGen, Mountain View, CA), em linha com um respirador Bird Mark 7A, e administradas a macacos cynomolgus anestesiados através de tubos endotraqueais (aproximando respiração tidal normal). Amostras de sangue foram tomadas

em vários pontos de tempo, e a quantidade de proteína contendo IFNB no resultante soro foi determinada usando um ensaio imuno de IFNB humano (Biosource International, Camarillo, CA). Parâmetros fármaco-cinéticos foram calculados usando o software WinNonUn. A Tabela 9 apresenta os resultados de macacos cynomolgus tratados com híbrido monômero-dímero IFN β Fc N297A ou homodímero IFN β Fc.

TABELA 9: ADMINISTRAÇÃO DE HÍBRIDO MONÔMERO-DÍMERO IFNBFC N297A E 5 HOMODÍMERO IFNBFC A MACACOS

| Proteína | Macaco # | Via | Dose ¹ Depositada Aproximada (μ g/kg) | Cmax (ng/ml) | AUC (h*ng/ml) | T _{1/2} (hr) | t _{1/2} avg (h) |
|---|----------|------|--|-----------------|------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Híbrido Monômero- dímero IFN β Fc N297A | C07308 | pulm | 20 | 23,3 | 987,9 | 27,6 | 27,1 |
| | C07336 | pulm | 20 | 22,4 | 970,6 | 25,6 | |
| | C07312 | pulm | 20 | 21,2 | 1002,7 | 28,0 | |
| Homodímero IFN β Fc | C07326 | pulm | 20 | 2,6 | 94,6 | 11,1 | 11,4 |
| | C07338 | pulm | 20 | 5,0 | 150,6 | 11,7 | |

¹ Baseado em fração de deposição de 15% de dose nebulizada como determinado por cintigrafia gama.

As fármaco-cinéticas de IFN β Fc com um ligante de 8 aminoácidos administrada a macacos cynomolgus são apresentadas na figura 15. A figura compara o homodímero IFN β Fc com o híbrido monômero-dímero IFN β Fc N297A em macacos após administração de uma dose pulmonar simples. Níveis em soro significantemente maiores foram obtidos em macacos tratados com o híbrido monômero-dímero compara ao homodímero.

Amostras de soro também foram analisadas para níveis de neopterina (um biomarcador de atividade de IFNB) usando um ensaio imuno neopterina (MP Biomedicals, Orangeburg, NY). Os resultados para estas análises são mostrados na figura 16. A figura compara estimulação de neopterina em resposta ao homodímero IFN β -Fc e o híbrido monômero-dímero IFN β -Fc N297A. Pode ser visto que níveis de neopterina significantemente maiores foram detectados em macacos tratados com híbrido monômero-dímero IFN β -Fc N297A comparado ao homodímero IFN β -Fc.

Todos os números expressando quantidades de ingredientes, condições de reação, e assim por diante usados no relatório descritivo e reivindicações são para serem entendidos como sendo modificados em todos os exemplos pelo termo "cerca". Da mesma maneira, a menos que indicado ao contrário, os parâmetros numéricos mostrados no relatório descritivo e reivindicações apostas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas buscadas serem obtidas pela presente invenção. No mínimo, e não como uma tentativa de limitar o pedido de patente da doutrina de equivalentes para o âmbito das reivindicações, cada parâmetro numérico deve ser construído na luz do número de dígitos significantes e abordagens de arredondamento comuns.

As formas de realização específicas aqui descritas são providenciadas a título de exemplo e não se destinam a ser limitativas de modo algum

Lisboa, 17 de Outubro de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Uma proteína quimérica compreendendo uma primeira cadeia polipeptídica e uma segunda cadeia polipeptídica,

em que a referida primeira cadeia de polipeptídeos compreende um factor de coagulação e, pelo menos, uma porção de uma região constante de imunoglobulina, que é um parceiro de ligação de receptor neonatal (FcRn), e

em que a referida segunda cadeia polipeptídica consiste numa região constante de imunoglobulina, ou uma sua porção, que é um parceiro de ligação FcRn, para utilização num método de tratamento.

2. A proteína quimérica da reivindicação 1, para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que as ditas porções de uma região constante de imunoglobulina são um fragmento Fc.

3. A proteína quimérica da reivindicação 1 ou reivindicação 2, para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a região constante de imunoglobulina é uma região constante de IgG1 ou IgG2.

4. A proteína quimérica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, para o uso de acordo com a reivindicação 1, em que o factor de coagulação é seleccionado a partir do grupo consistindo de Factor VII, Factor VIIa, Factor VIII, o Factor VIIIa, Factor V, Factor IX, Factor IXa, Factor X, Factor XI, factor XII, factor XIII, fibrinogénio, protrombina, e Factor de von Willebrand.

5. A proteína quimérica da reivindicação 4, para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o factor de coagulação é o Factor IX ou o Factor IXa.

6. A proteína quimérica da reivindicação 4, para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o factor de coagulação é o Factor VIII ou Factor VIIIa.

7. A proteína quimérica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a primeira cadeia polipeptídica compreende ainda um ligante entre o factor de coagulação e a porção da região constante de uma imunoglobulina.

8. A proteína quimérica da reivindicação 7, para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o ligante compreende 1-20 aminoácidos.

9. Uma composição farmacêutica compreendendo a proteína quimérica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

10. A proteína quimérica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, para utilização no tratamento de uma desordem hemostática.

11. A proteína quimérica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, para utilização no tratamento de hemofilia A.

12. A proteína quimérica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, para utilização no tratamento de hemofilia B.

13. A proteína quimérica de acordo com a reivindicação 1, para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína quimérica é administrada por via intravenosa, subcutânea, oral, bucal, sublingual, nasal, parentérica, rectal, vaginal, ou através de uma via pulmonar.

14. A proteína quimérica de acordo com a reivindicação 1, para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína quimérica é ser administrada por via intravenosa.

15. A proteína quimérica de acordo com a reivindicação 1, para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína quimérica é para ser administrada por via subcutânea.

16. Um primeiro polinucleótido que codifica a primeira cadeia de polipeptídeos da proteína quimérica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, e um segundo polinucleótido que codifica a segunda cadeia de polipéptido da referida proteína quimérica.

17. Os primeiro e segundo polinucleótidos de acordo com a reivindicação 16, em que cada um dos referidos polinucleótidos está presente numa vector de expressão.

Lisbos, 17 de Outubro de 2013

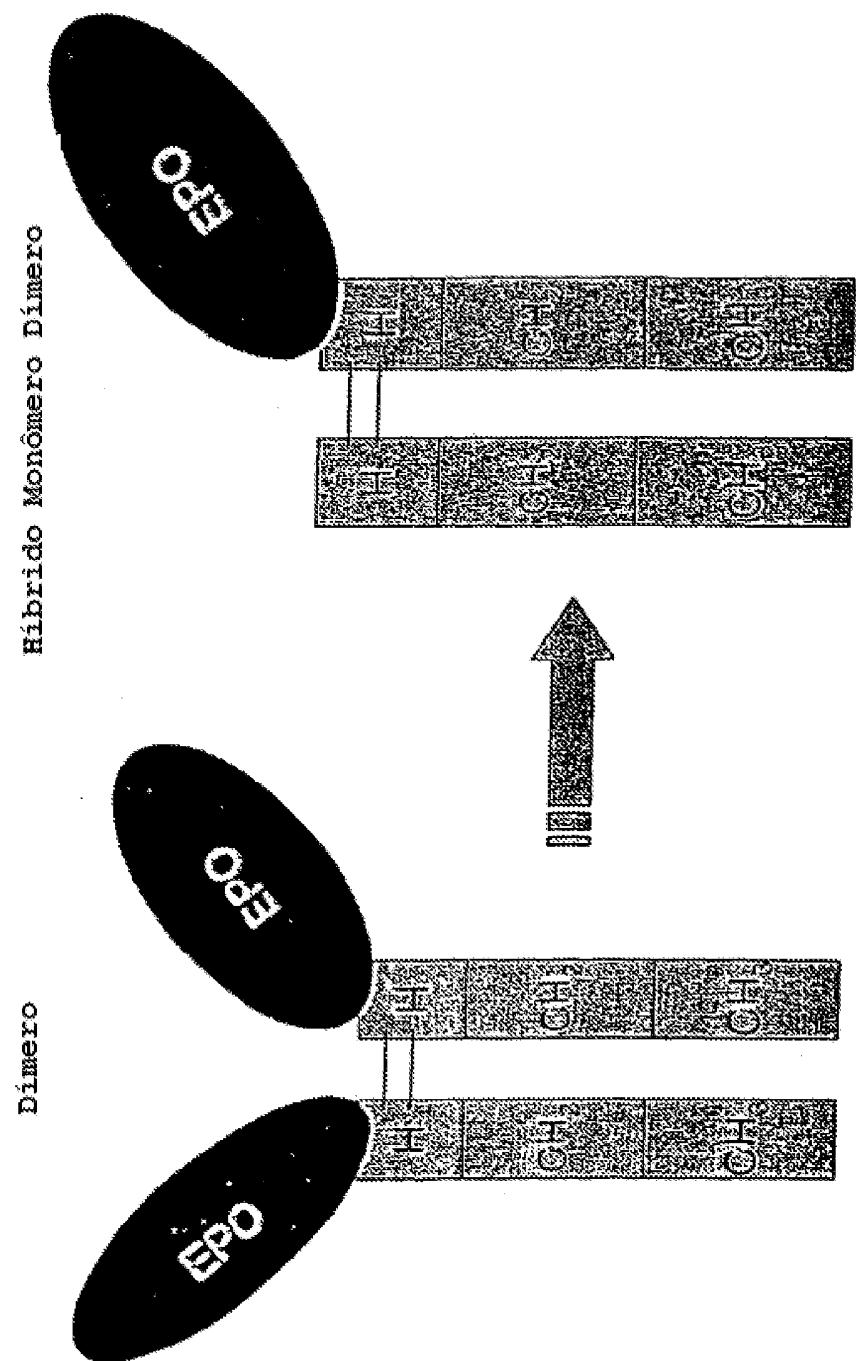


Fig. 2A

Sequência de aminoácido Fc-Fator VII (Peptídeo sinal sublinhado, pró-peptídeo em negrito)

1 **MVSOALELLC** LLLGLOGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRAN AFLEELRPGS
 51 LERECKEEQC SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK
 101 DQLOSYICFC LPAFEGRNCE THKDDQLICV NENGGEQYC SDHTGTRKSC
 151 RCHEGYSLLA DGVSCTPTVE YPCGKIPILE KRNASKPQGR IVGGKVCPKG
 201 ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWWVSAA HCFDKIKNWR NLLIAVLGEND
 251 LSEHDGDEQS RRVAQVIIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVPLC
 301 LPERTFSERT LAFVRFSLVS GWGQLLDRGA TALELMVLSV PRLMTQDCLO
 351 QSRKVGDSPN ITEYMFCAKY SDGSKDSCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV
 401 SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APPFDKTHTC
 451 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVXPN
 501 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
 551 ALFAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD
 601 IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSSFL YSKLTVDKSR WQQGNVPSCS
 651 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

Fig. 2B

Sequência de aminoácido Fc-Fator IX (Peptídeo sinal sublinhado, pró-peptídeo em negrito)

1 **MQRVNIMIMAE** SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG
 51 KLEEFVQGNL ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
 101 PCLNGGSCKD DINSYECWCP FGFEKGNCI DVTNCIKNGR CEQFCIANSAD
 151 NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPPCGR VSVSQTSLT RAETVFPDVD
 201 YVNSTEAEI LDNITQSTQS FNDFTRVVCG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
 251 FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIIEETEN EQKRNVIRII
 301 PHHNYNAAIN KYNHDIAILLE LDEPLVLMSY VTPICIADKE YTNIIFLKFGS
 351 GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNNMFCAGFH
 401 EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIIS WGEECAMKGK YGIYTKVSRY
 451 VNWIKEKTKL TEFAGAAAVD KTHTCPCCPA PELLGGPSVF LFPFPKPKDTL
 501 MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
 551 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEXTISKAKG QPREPVYTL
 601 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQOPENNY KTTPFVLSD
 651 GSFFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

Fig. 2C

Seqüência de aminoácido Fc-IFNa (Ligador de 8 aminoácidos) (Seqüência sinal sublinhado)

```

1 MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRISLF
51 SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF QKRETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAND
101 ETLADKPYTE LYQQLNDLEA CVIQGQGVTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT
151 LYLKEKKYSP CAWEVVRRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKEEF AGAAAVIDKTH
201 TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDEPEVK
251 FNNYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
301 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFP
351 SDIAVEWESN GQFENNYKTT FPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQOQNVFS
401 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

```

Fig. 2D

Seqüência de aminoácido ligador Fc-IFNa (Seqüência sinal sublinhado)

```

1 MALTPALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRISLF
51 SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF QKAETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAND
101 ETLADKPYTE LYQQLNDLEA CVIQGQGVTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT
151 LYLKEKKYSP CAWEVVRRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKEDK THTCPPCPAP
201 ELLOGPSVFL PPPDKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWyVDGV
251 EVHNAKTKP EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNNGKEYKCK VSNKALPAPI
301 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSRDELTKNQ VSLTCLVKG YPSDIAVEWE
351 SNGOPENNYK TTFPVLDSDG SFFFLYSKLT DKSRWQOQNV FSCSVMHEAL
401 HHHYTQKSLS LSPGK

```

Fig. 2E

Seqüência de aminoácido FcFlag (Seqüência sinal sublinhado)

```

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DDYKDDDDDKD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF
51 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVXFNWYVDG VEVHNAKTKP
101 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNNGKEYKC KVSNKALPAPI IEKTISKAKG
151 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNCQOPENNY
201 KTTPPVLDSD GSFFFLYSKLT VDKSRWQOGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
251 SLSPGK

```

Fig. 2F

Sequência de aminoácido Epo-CCA-Fc (Sequência sinal λ^b sublinhada, espira espiralada ácida em negrito)

```

1  MVPCTLLLLL AALAPTOT AGSRAPPRLI CDSRVLQRYL LEAKEAENIT
51  TGCAEHCSLN ENITVPDTKV NFYAWKRMEV GQQAVEVWQG LALLSEAVLR
101 GQALLLVNSSQ PWEPLQLHVD KAVSGLRSLT TLLRALGAQK EAISPPDAAS
151 AAPLRTITAD TPRKLFRVYS NPLRGKLLY TGEACRTGDR EFGGEYQALE
201 KEVAQLEAEN QALEKEVAQL EHEGGGFAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
251 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNNAKTKPR EQYNSTYRVV
301 SVLTVLHQDN LNGKEYKCKV SNKALFAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
351 SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQOPENNYKT TPPVLDSDGS
401 FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLS SPGK

```

Fig. 2G

Sequência de aminoácido CCS-Fc (Sequência sinal λ^b sublinhado, espira espiralada básica em negrito)

```

1  MVPCTLLLLL AALAPTOT AGEFGGEYQA LKKKVAQLKA KNQALKKKVA
51  QLKHKGGPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
101 EVKFNWYVDG VEVHNNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
151 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
201 FYPSDIAVEWE SNGQOPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
251 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

```

Fig. 2H

Sequência de aminoácido CysFc (Sequência sinal hIFNa sublinhada)

```

1  MALTFALLVA LIVLECKSSC SVGCFPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM
51  ISRTPEVTCV VVDVSNEDPE VKPNWYVDGV EVHNNAKTKPR EQYNSTYRV
101 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP
151 PSRDELTKNQV VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQOPENNYK TTPPVLDSDG
201 SFFLYSKLTV EKSRWQQGNVF PSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

```

Fig. 21

Sequência da proteína Fe GS151FNa (Sequência sinal sublinhada)

1 MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRISLF
 51 SCLKEDRHDFG FPQEEFGNQF QRAETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAND
 101 ETLLDKFYTE LYQQLNNDLEA CVIQQGVGTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT
 151 LYLKREKKYSP CAWEVVRRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKEGG GGSGGGGSGG
 201 GGSDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 251 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK
 301 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNOVSLTC
 351 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 401 QQGNVFPSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Fig. 23

Sequência de aminoácido EpoFe (Sequência sinal sublinhada, ligador em negrito)

1 MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE
 51 NITTGCAEHG SINENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAVEV WQGLALLSEA
 101 VLRGQALLVN SSQFWPEPLQL IVDKAVSGLR SLTLLRAG AQKEAISPPD
 151 AASAAPLRTI TADTPRKLFR VYSNFLRGKL KLYTGEACRT GDREPAGAAA
 201 VDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
 251 DPEVKFNWYV DGVEVHNAXT KPREEQYNST YRVVSVLT HQDWLNGKEY
 301 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV
 351 XGFYPSDIAV EWESNGQOPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 401 GNVFPSCSVNH EALHNHYTQK SLSLSPGK

Fig. 3A

Sequência de nucleotídeos Fator VII-Fe (Peptídeos ativo sublinhado, pro-peptídeos em negrito)

Fig. 3B

Sequência de nucleotídeos Fator IX-Fc (Peptídeo sinal sublinhado, pró-peptídeo em negrito)

atgcacgcgcgtgsacatatcatggcacaatcccccaggcctcatccacatctgccttttagat
atctactcaqtgtctgsatgtacagtttttttttgtatcatgaaaacgcacaaatctgaatcg
gccaaagaggtaattcaggtaatgttggaaagatgttgcacaggaaaccttgagagagaatgt
atggasgsaaaatgtsgtttgaagaagacccgagaaatgtttttgaaaacactgasagacaactg
sattttggasgcagtatgttgcgtggagatcagtgtgcgtccatccatgtttaaatggccggcag
ttgcacggatgacattaattccatgtatgttgcgtccatgtttgcgttgcacggaaatgt
gaatttagatgtaacatgtaaatgttgcacatgttgcgttgcacatgttgcgttgcacatgttgcgt
atccacsaagglygtttgcgttgcgtactgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
accaggcacttccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
gagactgttttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
tcactcaasagcacccaaatcattaatgacttcaactgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
gggtcaattcccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
gttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
tcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
tatccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
ctggacgaccccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
cgaaatcttccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
gagatcagcttttagtttcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
tctacaaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
catgtcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
sattattatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
cgttatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
acaaatccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
cttccccccaaatccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
gtggargtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
staatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
caccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
ctccccccccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
acacccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
aggcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
aaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
ccactacscgcsgsagsgccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
ccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt

440. 30

Sequência de nucleotídeo Fc-IFNa (Ligador de 8 aminoácidos)

Fig. 3D

Seqüência de nucleotídeo ligador IFNg-fcΔ

```

atgcgccttgcacctttgtttactggtgcccttctgggtgtcaggtgcacgtcaagctgtctgtctg
tgggtgtgatctgcctcasacccacagcctggtagcaggaggaccttgcgtctgcaca
gtgaggagaatctctttctctgtgtttggatggatcccccggag
gagttggcaaccagtccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgttccagcaga
tcttcasatcttcagcacaaggactctctgtctgttggatgagacccttcctagacaa
ctacactgaaacttaccagcagctgaatgacccgtgtgtatcagggggtgggggtg
acagagactccctgtgaaaggaggactccatttggctgtgagggaaatacttccaaagaaatca
ctctctatctgaaaggaaatcagcccttgcgtccctgggagggtgtcagagcagaatcat
gagatctttttttgtcaacaaacttgcasaggatgttggatggaaatggaaaggacaaaactcac
acgtccccgggtgcccagctccggaaactgttggcggaccgtcagtcttcccttcccccac
aaaccaaggacaccctcatgtatctccggacccctgaggtcacatgcgtgggtggscgtgag
ccacgasaccctgaggtcagttcaactgttgcgtggacggcgtggatgtcataatgcca
acaaagccgcggggaggagcgttacacacgacgttccgtgttgcgtccctaccgtctgc
accaggactggctgaaatggcaaggatgtcaaggatctccaaacaaaggccctccagcccc
catcgagaaatccatctccaaaggccaaaggcagccccggaaaccacaggtgtacccctgc
ccatccggatgagctgacccaggatcagctgcctgttgcgttgcataaggcttctatc
ccagcgacatcgcgtggagtggagagcaatggcagccggagaaacsactacaaggscacg
tccctgttggactccgacgggtcttcttctacsgcasgctcaccgtggacaaaggcagg
tggcagcaggggacgtttcatgttccgtgtatgcatgaggctgtgcacaaaccactacacgc
agaagagccctccctgttccggtaatgt

```

Fig. 3E

Seqüência de nucleotídeo FlagFc

```

atgcggccggacacacttctgtatcggtactgtgtctccgggttccactgtgtacg
acttcggggacgcacgtgacaaggcgsaaactcacacatgcccscctgccccagtcggasct
ccctggggacccgtcagtttcttcccccaaaacccasggacccctctgtatctccgg
acccctgagggtcscatgcgtgggtggacgtgagccacgcgaaaggacccctgagggtcaagtgc
actggtagtggacggcgtggagggtgcatsatgccaaggacaaaggccgcggggaggagcagtac
cacgtaccgtgtggcagcgtccctcaccgtctgcacccaggactggctgtatggcaggaggtac
segtgcagggtctccsacaaaggccctccaggccccatcgagaaaccatctccaaaggccasag
ggcggcccgagacccacagggtgtacaccctgcggggatggatgtaccggaaacca
ggcggccctgacctgcgtggatggacggcttcatcccgccatcgccgtggagtgggagagc
atgggcaggccggagaaactacacggaccacgcctccgtgttggactccgacggcttctat
tcctctacsgcasgctcaccgtggacaaaggcagggtggcagcaggggacgttttcatgttc
cgtgtatgcatgaggctgtgcacaaaccactscacgcgaaaggccctccctgttccggtaa
tga

```

Fig. 3F

Sequência de nucleotídeo Epo-CCA-Fc (Sequência sinal λ^b sublinhada, espira espiralada ácida em negrito)

atggtaaccgtgcacgctgtctgtgtttcgccggccctggctccgactcagacccgcgcg
gcgtcttagagccccaccacgcctcatctgtgcagccgagtccgtgcagggtagcttggaggc
 caaggaggccgagaatstacgcacggctgtgtgaacactgcagcttgaatgagaaatataact
 gtccctagacaccaaaagttatatttctatgtctgtgaagaggatggaggctggggcagcsgggccgttag
 saagtctggcaggccgtggccctgtgtcggaagctgtctgcggggccaggccctgttggtc
 ctcttcccagccgtggagccctgcagctgcatgtggatssagccgtcagtggccttcgcagc
 ctcaaccactctgtcttcggctctggagccageggaaagccatctccctccagatgcggcc
 cagctgtccscctccgaaacatcactgtgcacacttccgaaacttccgagtcscicccaa
 tttccctccgggaaagctgtacacageggaggccgtgcaggaccgtgacaggaaattc
 ggttgtgatgtaccaggccctggagaaggagggtggccctgtggaggccgagaaccaggccctgg
 sgaaggagggtggcccaagctggggcagccgggtggtagtccgcacccgtacgtgtggccggacc
 gtcagtcttcccttcccccacccaaaggacaccctcatgtatctccggacccctggaggcc
 acatgcgtgggtggactgtgagccacgcacccctgaggtcaagtcaactggtaacgtggacg
 gctggagggtgcataatgccaagscaagccgcggaggagcgtacacacgcacgttacccgtgt
 ggtcaagcgttccctaccgtctgcacccaggactggctgatggcaaggagtacaagtgcacggcc
 tccaaacaaaggccctcccaagccccatcgagssacccatctccaaaggccaaaggccgccccccgag
 aacccacagggtgacacccctgccccatccgggtgagctgaccaagaaaccaggtaacccgt
 ctgtctggtaaaggcttctatcccaagcgcatacgccgtggagtggtggagagcastggcagccg
 gagaacacactacaagaccaaggccctccgtgttggactccgacggctccctcttcccttcc
 agtgcaccgtggacaagagcaggtegcagcaggaaacgtttctatgtccgtatgcata
 ggctgtgcaccaaccactacacgcagaagacccatctccctgtctccggtsaatga

Fig. 3G

Sequência de nucleotídeo CCS-Fc (Sequência sinal λ^b sublinhada, espira espiralada básica em negrito)

atggtaaccgtgcacgctgtctgtgtttcgccggccctggctccgactcagacccgcgcg
 gcaatccgtgggtgatgtaccaggccctgtgcagaagaagggtggccctggacttgc
 gggccctgtgcagaagaagggtggccctgtgcaccaaggccggccggccggcc
 ggcggaccgtcagtcttcccttcccccacccaaaggacaccctcatgtatctccggaccc
 ctgtggacttgcacatgcgtgggtggactgtgagccacgcacccctgaggta
 cgtggacggcggtggagggtgcataatgccaagacaaaggccgcggggaggaggcagt
 taccgtgtggacttgcacccgtctgcaccaggactggctgatggcaaggagtaca
 gcaagggtctccaaacaaaggccctcccgccccatcgagaaatccatctccaaaggcc
 gccccggagccacagggtgtacaccctgtccccatccgggtgagctgaccaagaaccagg
 gccctgacccgtccctgtcaaggcttctatcccaagcgcacatgcggctggagtggtgg
 ggcagccggagaacactacaagacccacgcctccctgtgttggactccgacggctcc
 ctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggaaacgtttctatgtcc
 atgcacatgggtctgtgcaccaaccactacacgcagaagacccatctccctgtctccggtsaatga

卷之三

Sequência de nucleotídeos CysFe (sequência sinal hFNa sublinhada)

atggcccttgcaccttgcgtttactgggtggcccttcctggctoctcaqctgcacgtcaaaactctctcg
tcggctgccccggcgtgcccagctccggactgctggcgccgacogtcagtccttcctttcccccc
seasacccaaggcacccatgtatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggcgacgtg
agccacgaaagacccgtgggtcaagttcaactggtaacgtggacggcgtggaggtgcataatggca
sgacasaagccgcgggaggagcgtacaacagcactgttccgtgtggtaacggttcctcaccgtct
gcacccaggactggctgaatggcsaggagtacaagtgcasggtctccaaacaaaggccctccagcc
cccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccggagaaaccacagggtgtacacccctgc
cccatcccggtatggactgaccaagaaccaggtcagctgacctgcctggtaaaggcttc
tcccagcgsatcgccgtggagtggagagcataggcagccggagaccaactacsgaccacg
ccctcccggtttggactccgacggctcccttccttcacagcaagctcccggtggacaaagagca
ggtgtggcagcaggggasacgttttcatgtccgtgtgcgtgaggcttcgcacaaaccactacac
gcagaaagaccccttcgggtatgg

Fig. 31

Seqüência de nucleotídeos Fc GS15 IFNa (Seqüência viral sublinhada)

Fig. 3J

Sequência de nucleotídeo EpoFc (Sequência sinal sublinhada, ligador em negrito)

atggggactgcacgsatatcctgccttgtgtgggttcttcctgtcccttctcttcctccctctgg
gcctcccagttccctggggccccatccacgcctcatctgtgcacgcggagtccctggagaggtacct
 ctggaggcccaaggaggggccgagaatctcacgacgggtgtgtgcacactgcacgttgcgtgg
 atatcaactgtcccaagcacccaaatgtttaatttctatgcgtggaaaggatggaggtcgggcagc
 aggccgtsgaagtctggcaggccctggccctgtgtcgaaagctgttcctggggggccaggccct
 gttggtcactcttcccaegccgtggggagccctgtgcacgtgtggatssagccgtcagtggc
 cttcgcagctcaccactctgttccggctctggggagcccaagggagccatctccctccag
 atgcggcctcagergtccactccgcacaaatcaactgtgcacactttccgcacactctcccgagt
 ctactccaaatttctccggggaaactgtggactgttacacacggggccgtgcagaacaggggggc
 agaggttcggccggcgeggtgcgggtgcacaaacttcacatgcccacccgtgcggcagtcgg
 aactccggccggaccgtcagtcttcctttcccccaaaaaccccaaggacacccctcatgtatctc
 cccggacccctggggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacggacccctgggtccgg
 aacttgtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcacaaagacaaaggccggggggggcactaca
 scagcactgtacccgtgtggtcagcgttccctccacgttgcacccatccggatgggtgcaccc
 gtacaagggtggccagggtctccaaacaaagccctccacggcccccattcggatggatgg
 aacggggcagccccggagacccacagggtgttccacccatccggatggatggatgg
 edcagggtccggctgaccttcctggtcaagggtttctatcccaacggacatccggcgtggatgg
 gagcaatggggcagccggggasccatccacggacccscggctcccggtgtggatccggcactcc
 ttcttccttcacggcaagcttccacgggtggacaaaggagcagggtggcagcaggggasacgttttcaat
 gtcggatgtgtgtgtggatgtgcacaaacccatccscggcagaaggcccttcctgttcgg
 taatgt

VI

Várias maneiras para formar híbridos monômero/dímero através de ligação nativa. Notar que peptideo pode ser substituído com qualquer outra molécula pequena, ADN, etc.

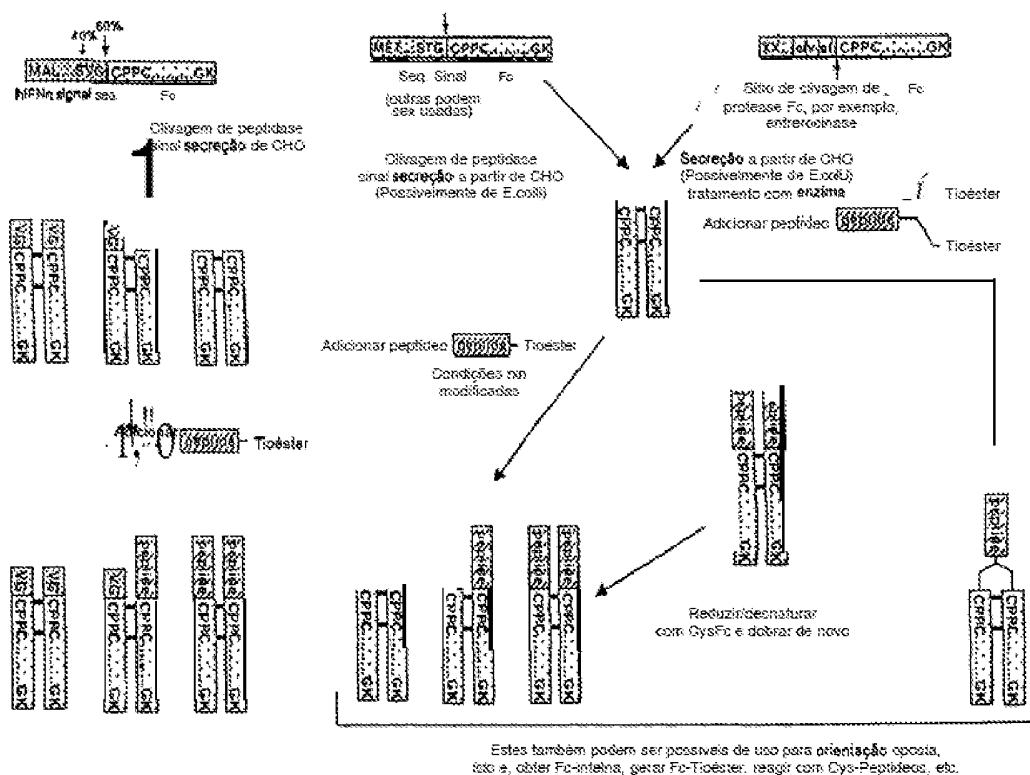


Figure 5a

Sequência de aminoácidos Fc-MESNA (Produzida no vetor TW1N1 de NEB; quando um FC-Intein-CBD é eluído de pérolas de quinina com MESNA produz a seguinte proteína com um tioéster terminal-C sobre o resíduo Fha final

1 MGIEGRGAAA VDTSHCPCPAPELLOOPS VFLFPKKPKD TLMISRTPEV
51 TCVVVVDVSHEDPEVKFNWYV EGVEVHNAKT KPREEQYQNST YRVVVEVLTVL
101 HGDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISSKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT
151 KNOVSLTCLV KGFPYPSDIAY EWEENGOPEN NYKTTPEVLD SDGSFFLYSK
201 LTYDINKERWQOQ GNVFSCSVNN EALMNHYTQK SLSLSFGF

Figura 3 b Sequência de nucleotídeos de Fc CDS em pTW1N1, o resíduo 5 final, ttt, directamente de encontro ao Mex Gyra CDS em pTW1N1

atgggcattgasygcggccgcgtgcggtcgatactgtcacsatgcggccaccgtggccag
caccgtggactctggggggacccgtcagtcttcttcccccacaaacccsagggacaccctcat
gatctcccgaccccttgggtcacatgcgttgtgtggacgtggccacgaaagacccctggggtc
segttcaaciggtacgtggacggcggtgcataatgcacaaacaaagccgcgggaggagc
agttaacacagcgcgtaccgtgtggtcaggtcccacccgttgcaccaggactggctaatgg
caaggagttacaaatgtgcagggtctccacaaagccctcccgccatcgagaaaccatetcc
aaaggccaaaggccaggccggaggaaaccacagggtgtacccctgtccccccatccccggatggatgtga
ccaaagaaccagggtcggctgcactgtccgttgcacccctgtccatccccggatggatgtga
gtggggaggcataggccggcggggaaaccaactacaagaccacgttcccggtgtggactccgac
ggctcccttcccttcacggcagctcacccgtggccaaaggcagggtggccggcggcggaaacgtct
tccatgtccgtgtatgcgtgggtctgtgcaccaaccactacacgcggccgggtctctccctgtc
tccgggttt

Fig.6

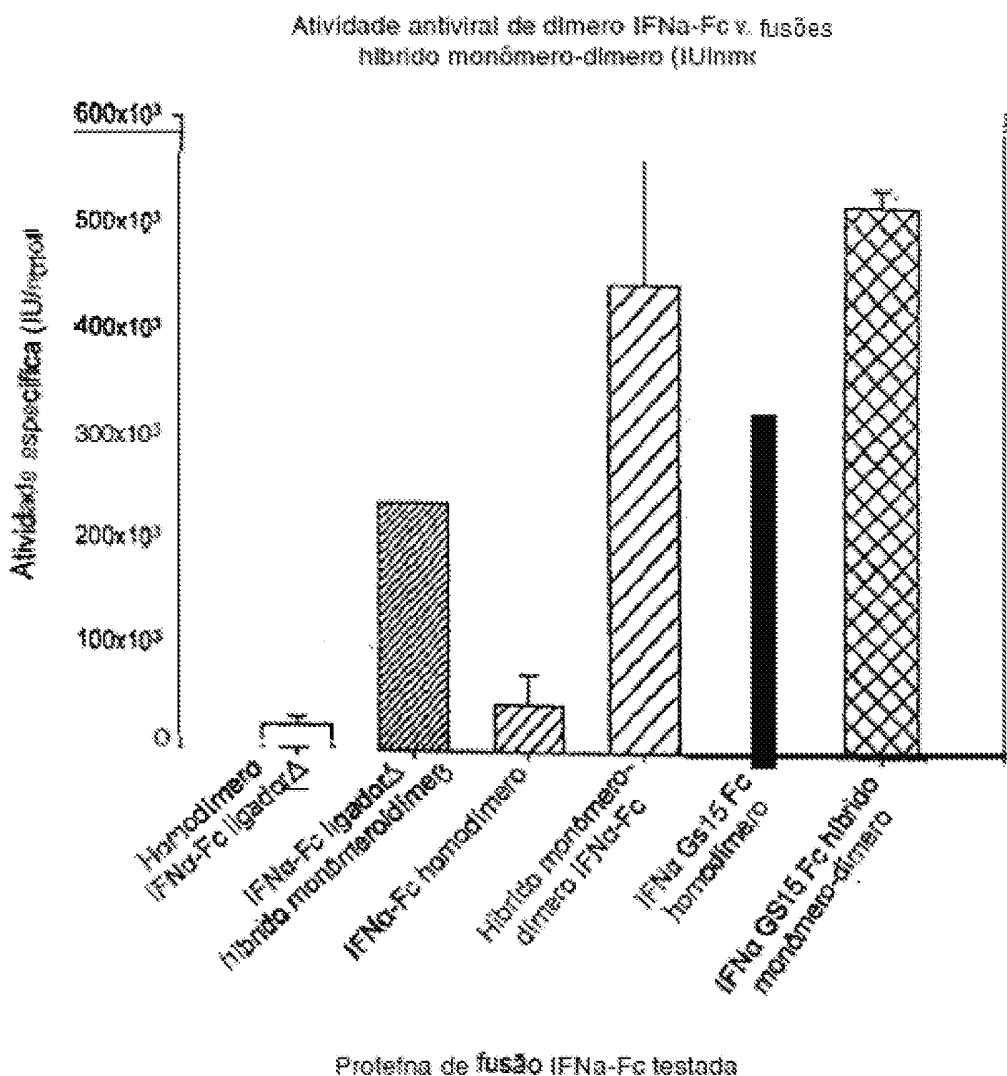


Fig. 7

Ensaio de coagulação STA-CLOT Villa-rTF

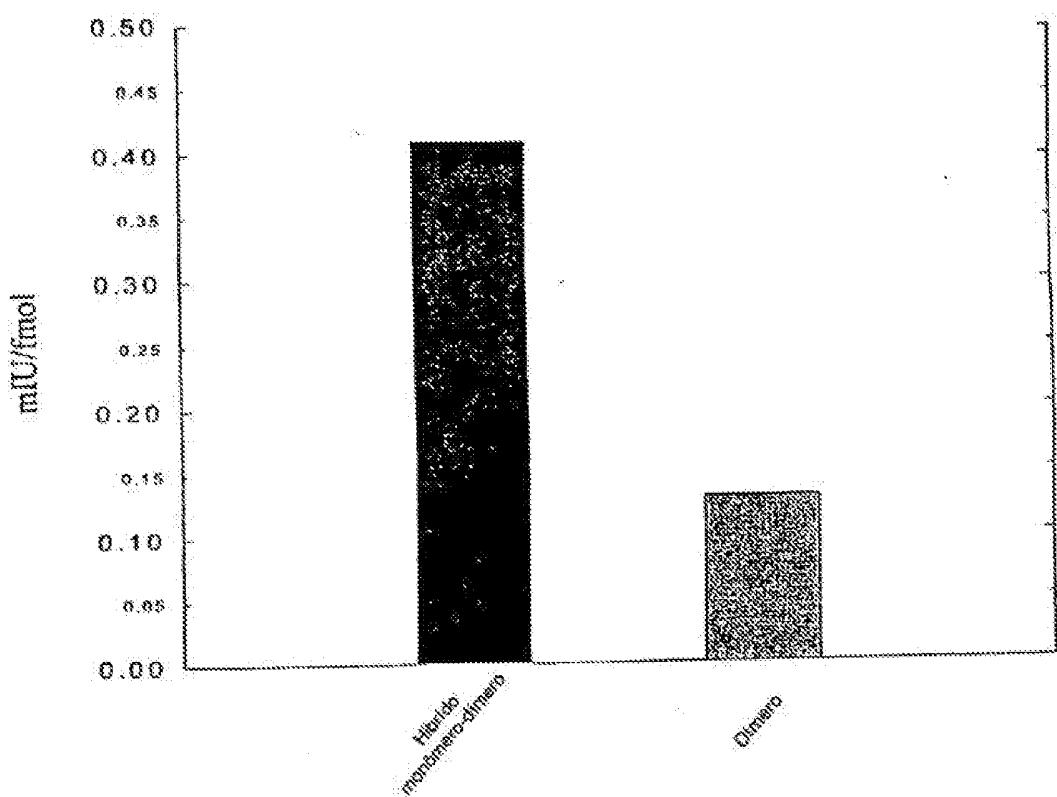


Fig. 8

FVII:Ag Elisa, Torna oral em ratos neonatais

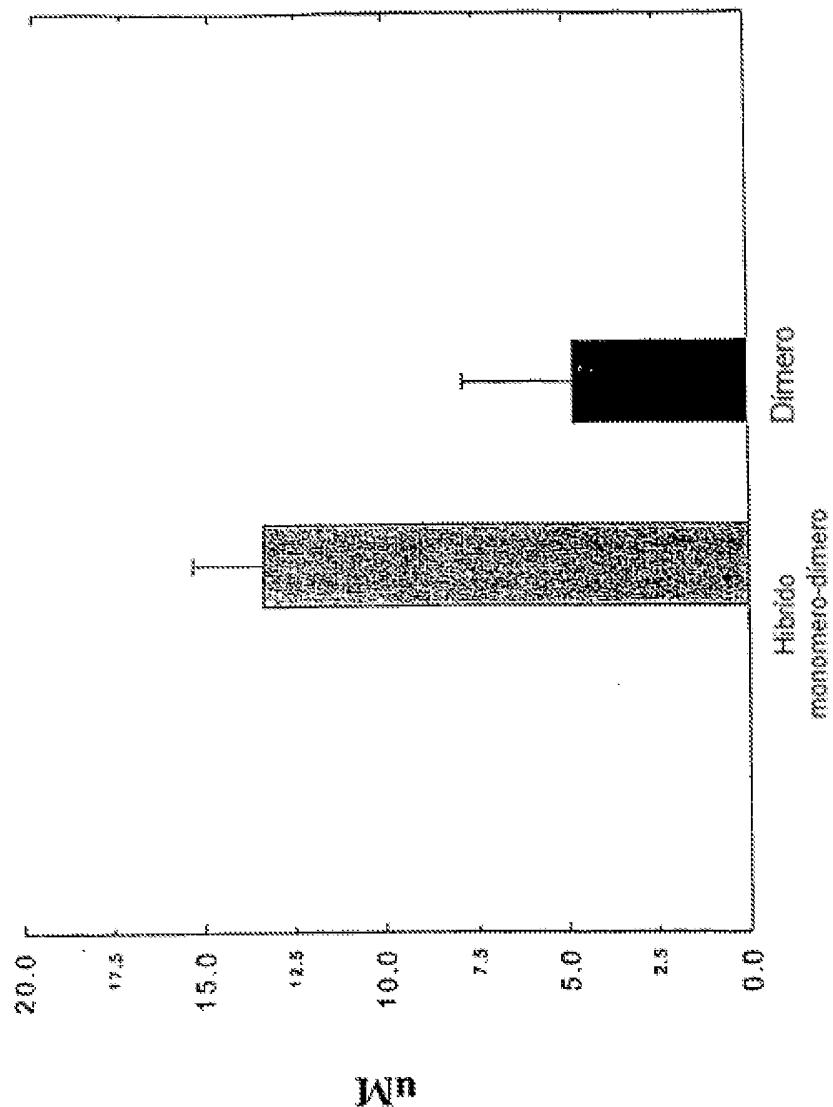


Fig. 9

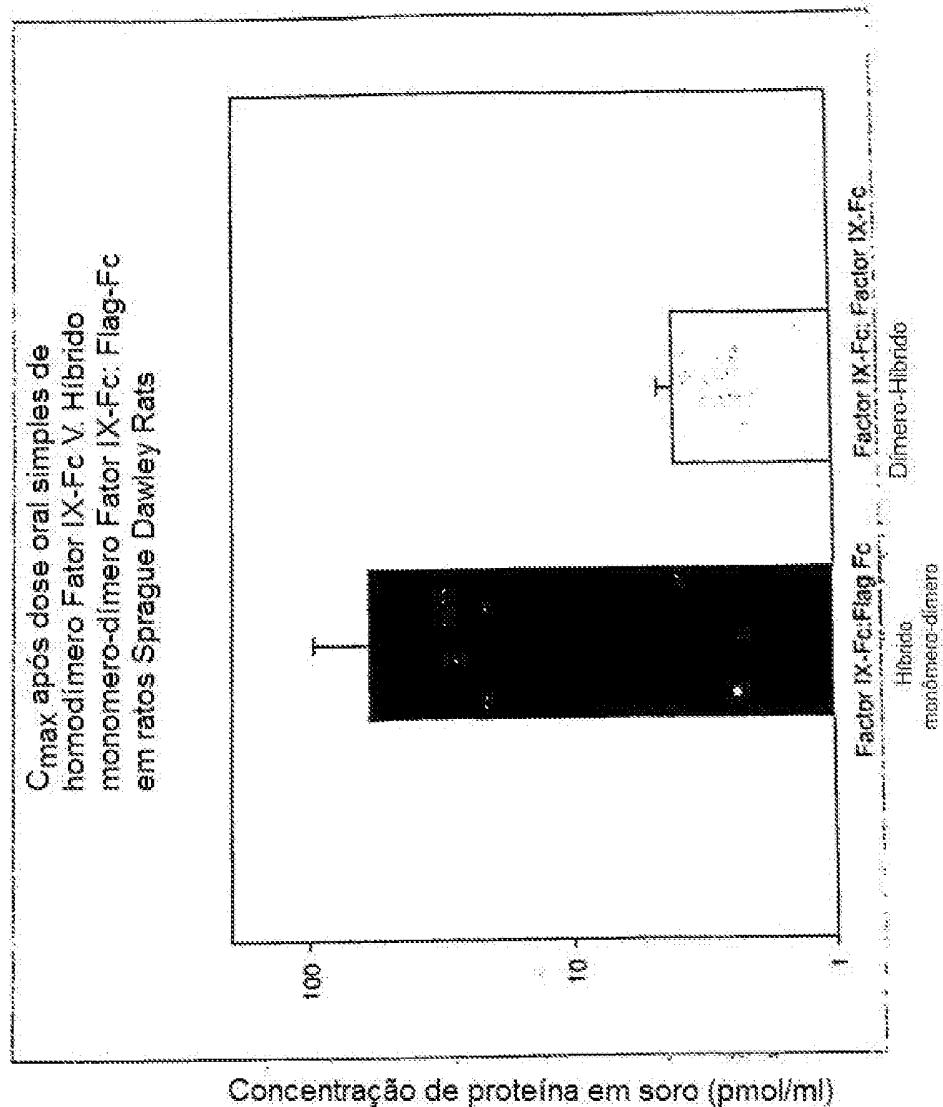


Fig. 10

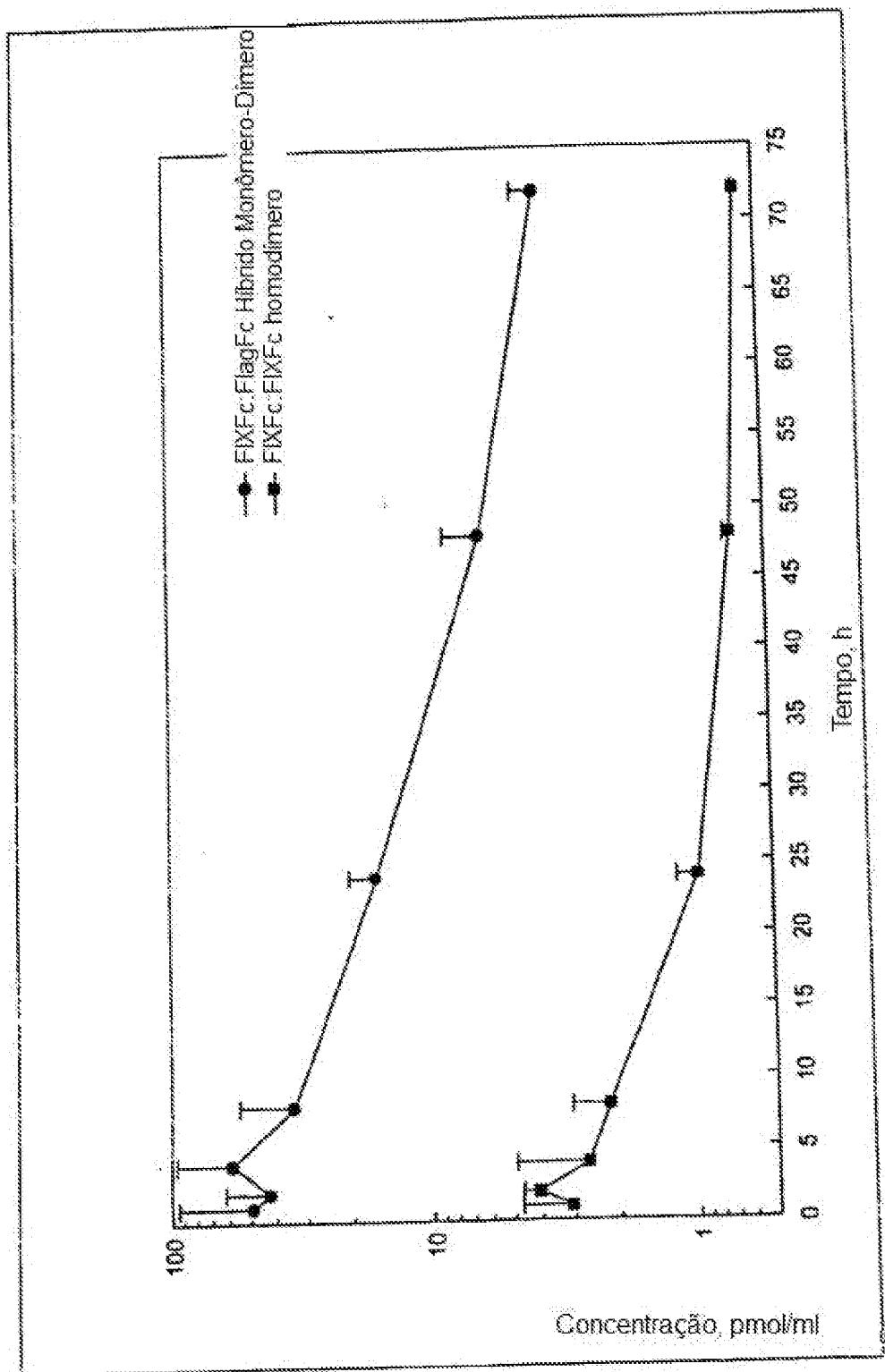


Fig. 11

Fármaco-Cinéticas de Dímero EpoFc v. Híbrido Monômero-Dímero em macacos *Cynomolgus* após uma comparação molar de dose pulmonar simples

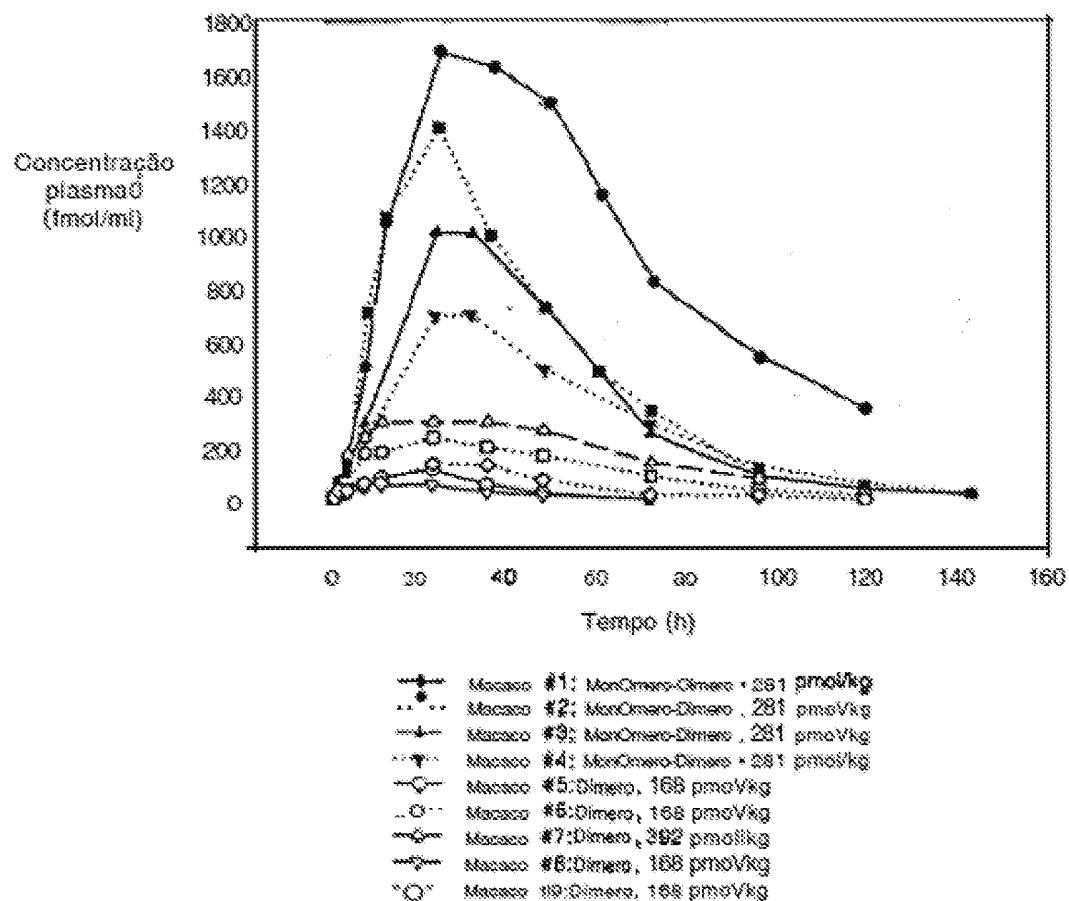


Fig. 12

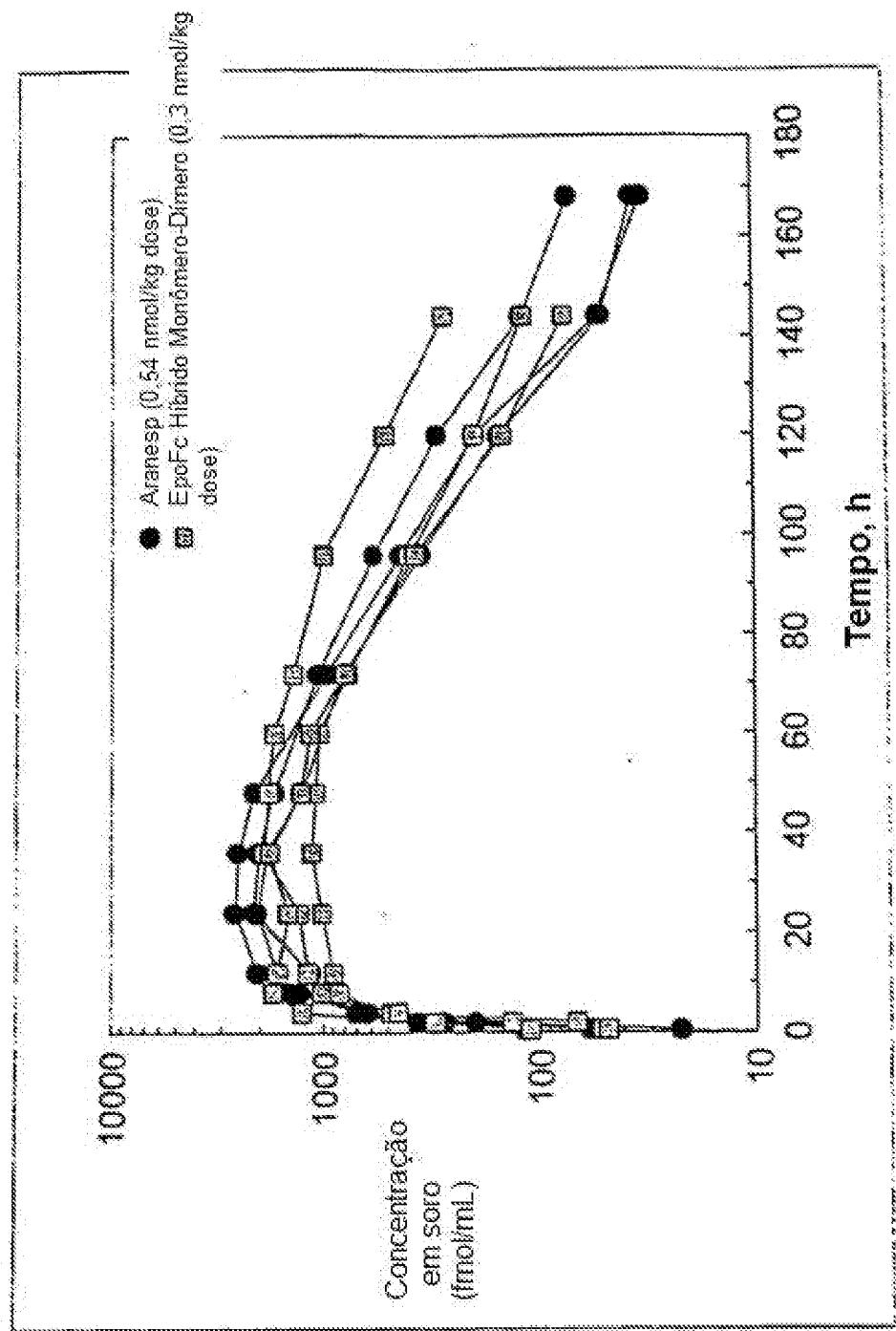
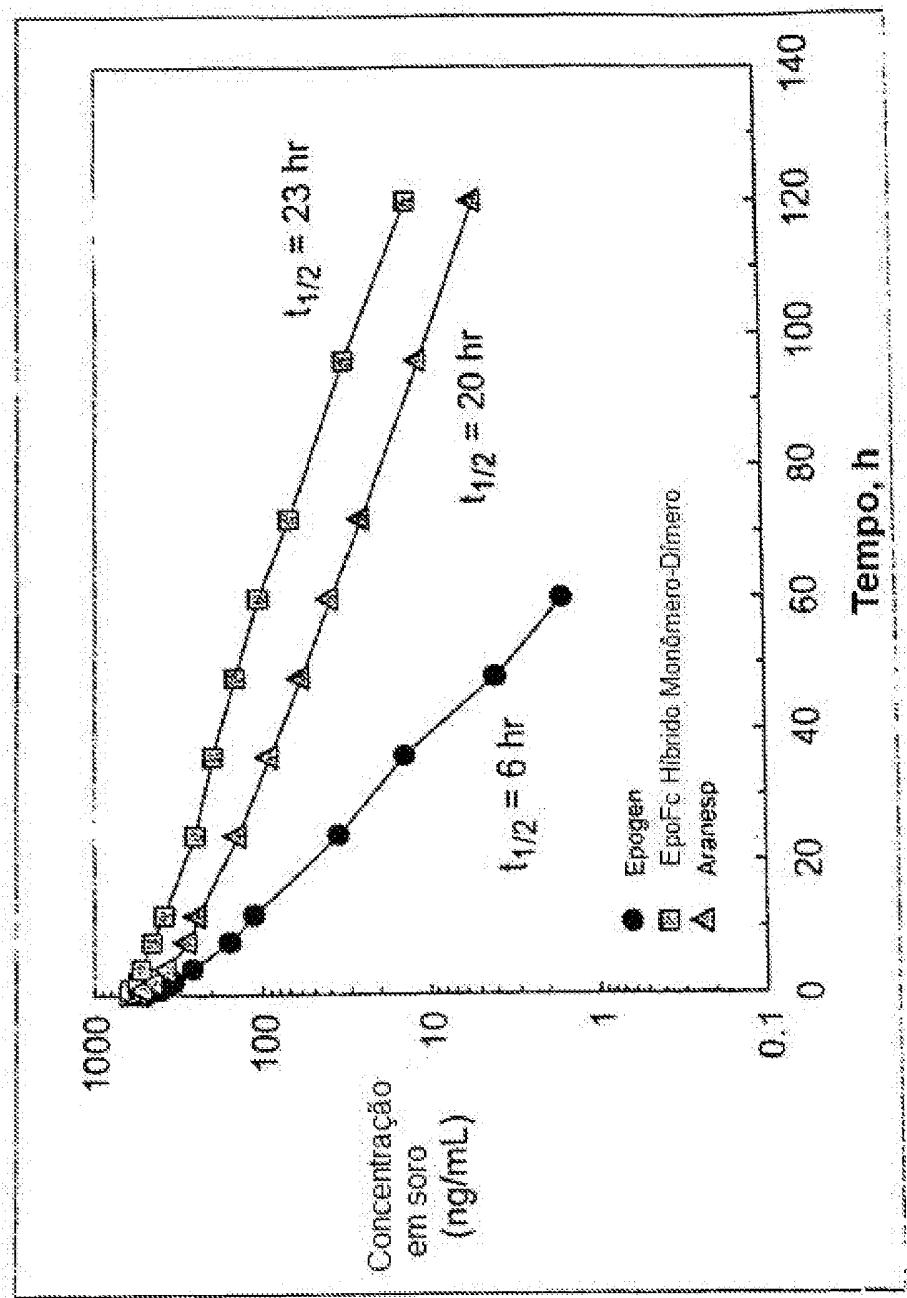


Fig. 13



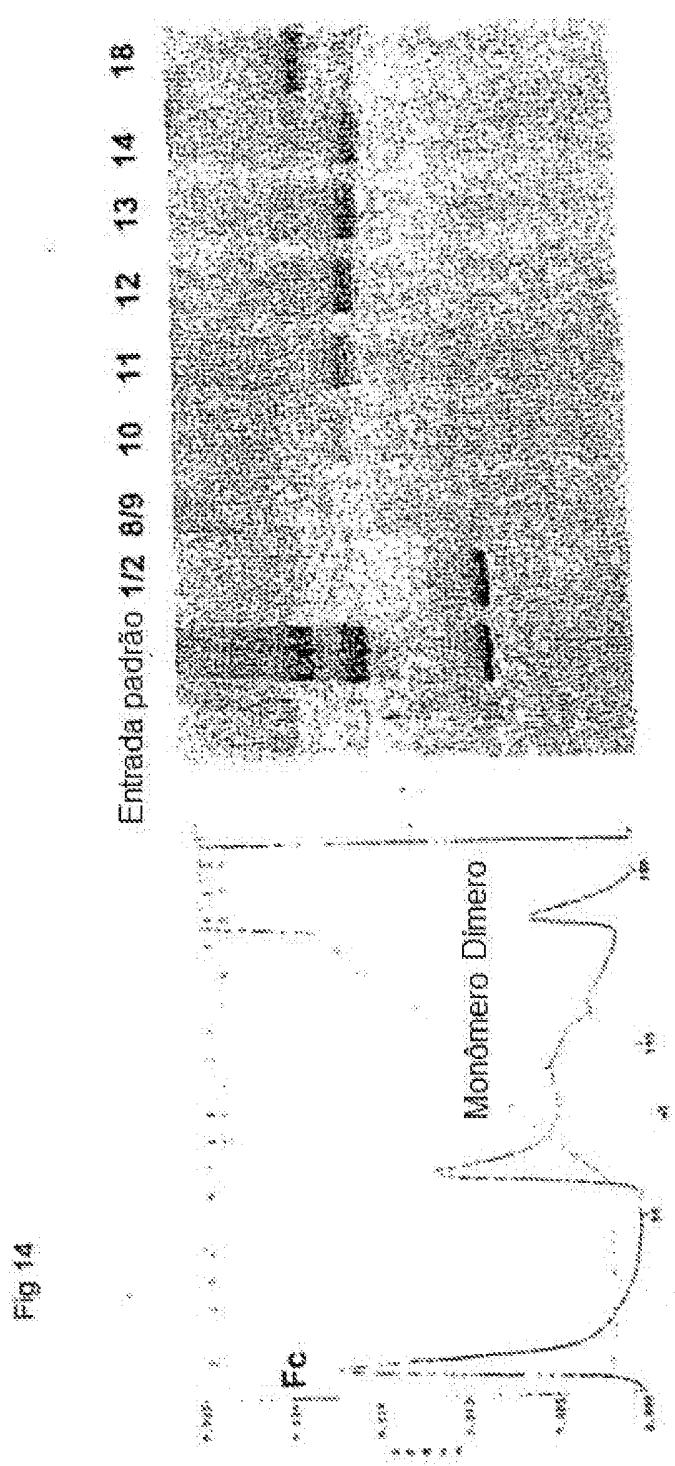


Fig. 15

Fármaco-Cinéticas de IFN β -008 (Ómtero IFN β -Fc wt) e IFN β -009/Fc-014 (Monômero IFN β -Fc N297A em soro de macaco após uma dose pulmonar simples de 20 μ g/kg

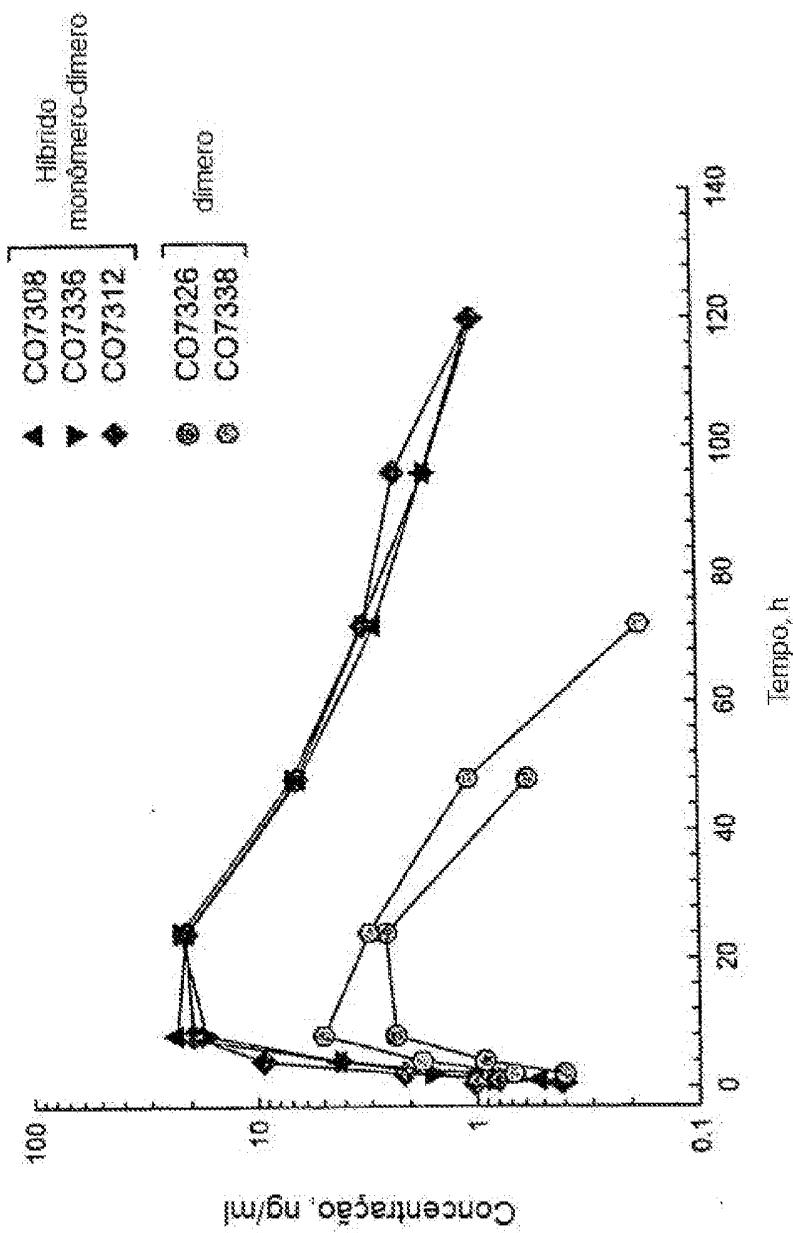


Fig. 16

Níveis de Neopterin em soro de macaco *Gymomelus* após uma dose pulmonar simples de 20 µg/kg de IFN β -008 (Dímero IFN β -Fc wt) e IFN β -009/Fc-014 (Monômero IFN β -Fc N297A)

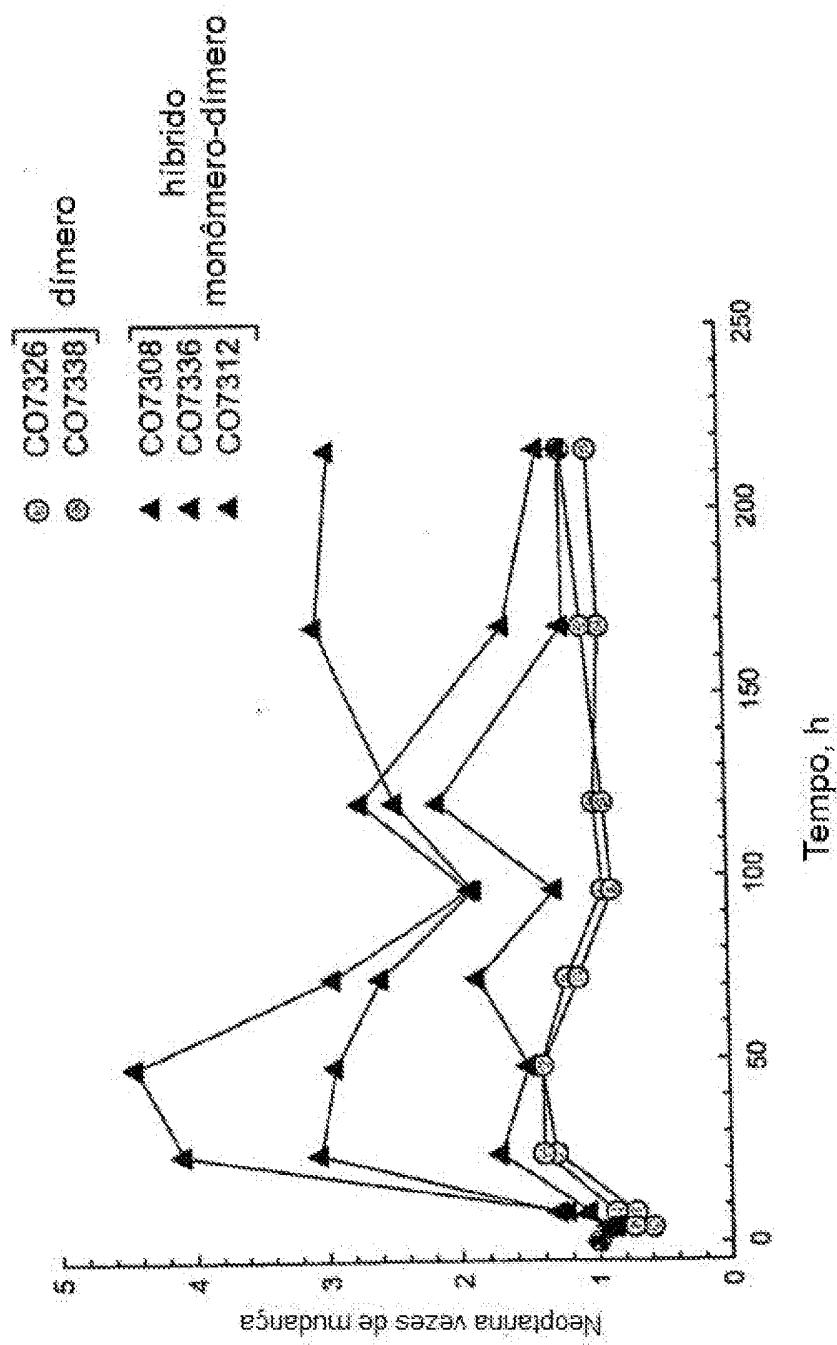


Fig 17a.

Fig. 17b.

Sequência de aminoácido IFN β -Fc (Sequência sinal sublinhada, sequência ligadora em negrito, N297 em negrito sublinhado)

| | | | | | |
|-----|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| 1 | MTNKCLLQIA | LLICFSTTAL | SMSYNLLGFL | QRSSNFQCQK | LLWQLNQRLE |
| 51 | YCLKDPRMNF | IPEEIXQLOQQ | FQKEDAALTI | YEMLQNIPAI | FRQD8SSTGW |
| 101 | NETIVENLLA | NWYHQINHLK | TVLEEKLEKE | DFTRGKLMSS | LHLKRYYYGRI |
| 151 | LHYLKAKEYS | NCAWTIVRVE | ILRNFYFINR | LTGYLRNEFA | GAAAVIDKTHT |
| 201 | CPPCPAPFELL | GGPSVFLFPP | KPKDTLMISR | TPEVTCVVVD | VSHEDPEVKP |
| 251 | NWYVDGVENVH | NAKTKPREEQ | YINSTYRVVSV | LTVLHQDWLN | GKEYKCKVSN |
| 301 | KALPAPIEKT | ISKAKGQPRE | PQVYTLPPSR | DELTKNQVSL | TCLVXGFYPS |
| 351 | DIAVEWESNG | OPENNYKTTP | PVLDSDGSFF | LYSKLTVDKS | RWQQGNVFSC |
| 401 | SUMHEALHNN | YTOKSLSLSP | GK | | |

Fig.18A

YTSLIHSLIEESONOOEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO: 99).

Fig.18B

NNLRAIEAQOHLLOLTVWGIKOLQARILVERYLKDO (SEQ ID NO: 100)

Fig.18C

WQEWEOKITALLEOAQIOQEKENYELOKLDKWASLWEWF (SEQ ID NO: 101)