

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2003.10.14</b>	(73) Titular(es): <b>KLAUS PFIZENMAIER SEEHAUSSTRASSE 7 75233 TIEFENBRONN DE HARALD WAJANT DE</b>
(30) Prioridade(s): <b>2002.10.14 DE 10247755</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2005.07.13</b>	(72) Inventor(es): <b>KLAUS PFIZENMAIER DE HARALD WAJANT DE</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.04.27 141/2011</b>	(74) Mandatário: <b>ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **ACTIVAÇÃO LOCAL, SELECTIVA, DE MEMBROS DA FAMÍLIA DE LIGANDOS TNF DE PROTEÍNAS DE FUSÃO DE LIGANDO TNF NÃOANTICORPO, SISTEMICAMENTE INACTIVAS**

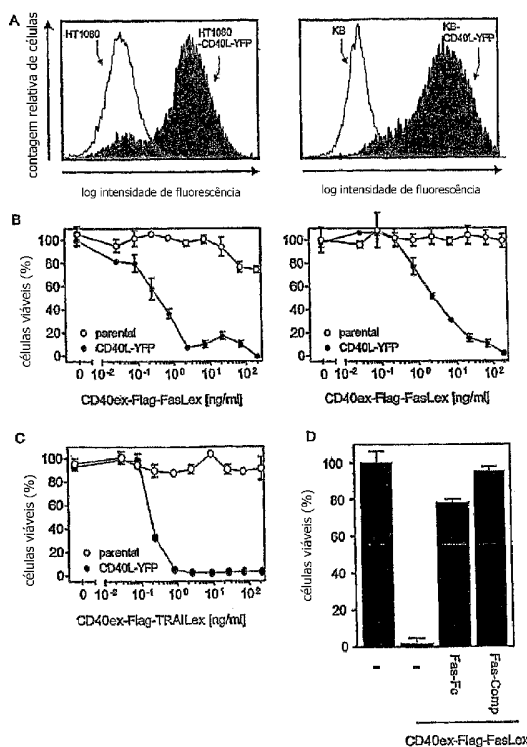
(57) Resumo:

O INVENTO REFERE-SE A POLIPÉPTIDOS COMPREENDENDO UM EFECTOR E UM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DE MOLÉCULA DE SUPERFÍCIE CELULAR QUE SÃO LIGADOS POR UM PÉPTIDO DE LIGAÇÃO. O DOMÍNIO EFECTOR, ESPECIALMENTE O DOMÍNIO EXTRACELULAR, É UM FRAGMENTO DE UM MEMBRO DA FAMÍLIA DE LIGANDOS TNF (MÓDULO 1) QUE É BIOLOGICAMENTE INACTIVO PER SE OU É ACTIVO NUMA EXTENSÃO LIMITADA. O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DE MOLÉCULA DE SUPERFÍCIE CELULAR (MÓDULO 2) É UMA SECÇÃO DE AMINOÁCIDO QUE SE LIGA SELECTIVAMENTE A UMA ESTRUTURA DE SUPERFÍCIE DA MEMBRANA PLASMÁTICA, DE PREFERÊNCIA A UMA PROTEÍNA DE MEMBRANA, MAS QUE NÃO É DERIVADA DE IMUNOGLOBULINA. O INVENTO REFERE-SE TAMBÉM A CONSTRUÇÕES DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM OS POLIPÉPTIDOS, VECTORES QUE OS CONTÊM, CÉLULAS HOSPEDEIRAS TRANSFECTADAS COM ELES, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS OBJECTOS DO INVENTO ACIMA MENCIONADOS, MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DOS POLIPÉPTIDOS DO INVENTO E UTILIZAÇÕES DOS OBJECTOS DO INVENTO PARA FINS TERAPÊUTICOS.

**"Activação local, selectiva, de membros da família de ligandos tnf de proteínas de fusão de ligando tnf não-anticorpo, sistemicamente inactivas"**

RESUMO

O invento refere-se a polipéptidos compreendendo um efector e um domínio de ligação de molécula de superfície celular que são ligados por um péptido de ligação. O domínio efector, especialmente o domínio extracelular, é um fragmento de um membro da família de ligandos TNF (módulo 1) que é biologicamente inactivo *per se* ou é activo numa extensão limitada. O domínio de ligação de molécula de superfície celular (módulo 2) é uma secção de aminoácido que se liga selectivamente a uma estrutura de superfície da membrana plasmática, de preferência a uma proteína de membrana, mas que não é derivada de imunoglobulina. O invento refere-se também a construções de ácidos nucleicos que codificam os polipéptidos, vectores que os contêm, células hospedeiras transfectadas com eles, composições farmacêuticas contendo os objectos do invento acima mencionados, métodos para a produção dos polipéptidos do invento e utilizações dos objectos do invento para fins terapêuticos.



**"Activação local, selectiva, de membros da família de ligandos tnf de proteínas de fusão de ligando tnf não-anticorpo, sistemicamente inactivas"**

DESCRIÇÃO

O presente invento refere-se a polipéptidos constituídos por um efector e um domínio de ligação de molécula de superfície celular que são ligados por um péptido de ligação. O domínio efector é um fragmento, em particular o domínio extracelular, de um membro da família de ligandos TNF (módulo 1) que por si só é biologicamente inactivo ou de actividade restrita. O domínio de ligação de molécula de superfície celular (módulo 2) é um segmento de aminoácidos que se liga selectivamente a uma estrutura de superfície da membrana plasmática, de preferência a uma proteína de membrana, mas não é derivado de uma imunoglobulina. Adicionalmente, o invento proporciona construções de ácidos nucleicos que codificam os polipéptidos, vectores contendo estes, células hospedeiras transfectadas com eles, composições farmacêuticas contendo os referidos objectos do invento, processos para a construção dos polipéptidos de acordo com o invento e utilizações dos objectos de acordo com o invento para fins terapêuticos.

Em estudos *in vitro*, as citocinas, por exemplo, os membros da família de ligandos TNF, por exemplo, TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand - Ligando Indutor de Apoptose Relacionado com TNF), também denominado Apo2L (Wiley *et al.* (1995), *Immunity* 6: 673-682, Pitti *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271: 12687-12689), e, por exemplo, FasL têm uma forte acção apoptótica em muitas células de tumores de origem animal e humana. No caso de TRAIL, parece que as células malignas não são afectadas. Além disso, nos modelos animais pré-clínicos estudados (ratinho, macaco) não se observaram quaisquer indicações de toxicidade aguda ou outros efeitos secundários sistémicos de TRAIL, o que pode ser visto como limitante da terapêutica (Walczak *et al.* (1999) *Nat Med* 5:157-163, Ashkenazi *et al.* (1999) *J Clin Invest* 104: 155-162). No entanto, estudos recentes *in vitro* sobre hepatócitos humanos primários indicaram uma forte acção citotóxica no caso de um produto TRAIL recombinantemente produzido ou de

TRAIL na membrana, a forma que ocorre naturalmente desta citocina (Jo *et al.* (2000) *Nat Med* 6: 564-567, Ichikawa *et al.* (2001) *Nat Med* 7: 954-960). Por conseguinte, actualmente, está excluída uma aplicação clínica sistémica de variantes solúveis especiais de membros da família de ligandos TNF (em particular TNF, FasL, TRAIL e CD40L), que são biologicamente activas e, por conseguinte, têm essencialmente a acção dos ligandos na membrana, devido aos efeitos secundários que ocorrem. O mesmo aplica-se aos anticorpos agonistas que activam os receptores correspondentes a estes ligandos. Assim, por exemplo, para FasL (ligando do receptor Fas (Fas, CD95)), o protótipo de citocinas apoptóticas, não foi *a priori* adquirida uma aplicação clínica por razões de segurança, uma vez que os anticorpos agonistas contra este receptor, Fas, são extremamente hepatotóxicos *in vivo* (Ogasawara *et al.* (1993) *Nature* 364: 806-809). Finalmente, foi também mostrado que FasL na forma solúvel, em contraste com a sua forma na membrana, não tem praticamente qualquer actividade biológica (Schneider *et al.* (1998) *J. Exp. Med.* 187: 1205-1213).

Assim, as variantes dos membros da família de ligandos TNF disponíveis de acordo com o estado da arte não são utilizáveis ou são apenas utilizáveis numa extensão muito limitada (por exemplo, no caso de TNF sob condições denominadas "perfusão de membro isolado") para aplicação terapêutica, por exemplo, para o tratamento de tumores, quer devido à ausência de actividade biológica quer devido aos efeitos secundários extremos.

A WO 02/22680 descreve proteínas de fusão, nas quais os fragmentos que por si só não são biologicamente activos ou que o são apenas numa extensão restrita, por exemplo, de citocinas TNF, são ligados através de um péptido de ligação a um anticorpo de ligação a antigénio ou a um seu fragmento de ligação a antigénio. No entanto, há necessidade para sistemas alternativos, uma vez que, não raramente, não há quaisquer anticorpos correspondentes (ou fragmentos de anticorpos) disponíveis para certas moléculas de superfície celular, ou a ligação do antigénio ocorre num local diferente do esperado, por exemplo, sem a especificidade adequada.

Agora, o presente invento é baseado no objectivo de proporcionar um sistema alternativo, em particular não dependente de anticorpos, com o qual seja possível manifestar a acção de ligandos da família TNF (ou seus fragmentos) de uma forma alvo e específica de tecido ou célula e assim evitar ou, pelo menos, limitar marcadamente certos efeitos secundários sistémicos em tecidos/células não pertencentes ao tecido alvo, durante a utilização clínica.

Este problema é resolvido pelas concretizações do presente invento caracterizadas nas reivindicações.

De acordo com o invento, é proporcionado um polipéptido compreendendo um segmento (1), que contém um domínio de ligação de molécula de superfície celular (também denominado módulo 2), em que o domínio de ligação de molécula de superfície celular não é derivado de uma imunoglobulina, um segmento (2), que é um péptido de ligação, e um segmento (3), que contém um fragmento de um membro da família de ligandos TNF (também referida abaixo como "citocinas TNF" ou "família de ligandos de receptor TNF") que por si só é biologicamente inactivo/de actividade restrita (também denominado módulo 1), em que o fragmento no segmento (3) tem um domínio extracelular de um membro da família de ligandos TNF ou uma variante da sequência nativa do domínio extracelular, tendo, pelo menos, 80% de homologia de sequência e em que o fragmento no segmento (3) só se torna biológica e completamente activo através da ligação do segmento (1) à molécula de superfície celular.

De acordo com uma concretização preferida, os segmentos (1) a (3) no polipéptido (= proteína de fusão de acordo com o invento = construção de proteína de acordo com o invento) são dispostos do terminal-N ao terminal-C.

O presente invento é baseado na observação de que os ligandos da família TNF que ocorrem naturalmente na membrana, quando são proteoliticamente processados pelo organismo numa forma solúvel correspondente ao domínio extracelular, ou são biológica e completamente inactivos, ou são apenas activos numa extensão restrita, por exemplo, em certos subtipos de receptores de membrana. Isto aplica-se também a derivados

recombinantemente produzidos que correspondam aos domínios extracelulares dos ligandos em questão. De modo interessante, tais ligandos solúveis, biologicamente inactivos, são ainda absolutamente capazes de ligação ao seu receptor de membrana complementar, sem, no entanto, efectuarem uma activação do receptor, i.e. a transdução de sinal e desencadeamento de uma reacção celular. A descoberta de acordo com o invento é a de que um tal ligando que é inactivo/de actividade restrita (módulo 1) através da fusão com um outro componente peptídico (módulo 2), que não consista num anticorpo ou fragmento de anticorpo e que permita uma ligação específica a uma estrutura situada na membrana celular independente da fracção de ligando TNF, atinja de novo actividade biológica (completa) se este componente peptídico conduzir a ligação a uma superfície celular. A reconstituição da acção biológica do módulo 1 assim obtido torna-se activa quer contra as células alvo reconhecidas pelo próprio módulo 2 quer também contra células adjacentes, desde que estas expressem cada uma os receptores adequados para o fragmento de ligando TNF (módulo 1) contido na proteína de fusão.

O domínio de ligação de molécula de superfície celular (segmento (1) ou módulo (2)) da proteína de fusão de acordo com o invento media a ligação da proteína de fusão a células que tenham a estrutura de superfície adequada. O invento é caracterizado com base nos módulos específicos através de duas propriedades que têm como resultado o de que a proteína completa adquira propriedades que nenhum dos módulos utilizado possui isoladamente e que não são previsíveis.

A primeira propriedade relacionada com isto é a de que o domínio de ligação de molécula de superfície celular na proteína de fusão não seja obtido pelo princípio da utilização de anticorpos ou fragmentos derivados deles (por exemplo, ScFv), correspondendo ao estado da arte, mas em vez disso, contrariamente aos domínios de ligação de antigénio de anticorpos normalmente utilizados, outros domínios de ligação de molécula de superfície celular sejam inesperadamente capazes de comunicar actividade efectora completa e, por conseguinte, altamente eficaz especificamente dirigida para as células alvo de fragmentos de citocinas TNF que por si só eram biologicamente inactivas/de actividade restrita por

ligação a certas estruturas de superfície celular, em particular a proteínas de membrana. Os domínios não imunoglobulina, preferidos, para ligação às estruturas de superfície celular são, por exemplo, hormonas de péptido ou citocinas, péptidos pequenos, mas receptores específicos para ligandos na membrana (ou, de preferência, em cada caso, aqueles seus fragmentos que entram na ligação específica).

A segunda propriedade consiste em que o domínio efector por si só e também na proteína de fusão seja biologicamente inactivo ou tenha pouca actividade em células que não possuam a estrutura de superfície que é reconhecida pelo domínio de ligação de molécula de superfície celular, i.e. o receptor correspondente ao domínio efector não seja activado. A propriedade surpreendente, apenas possuída pela proteína de fusão completa, é a de que o domínio efector (fragmento de uma citocina TNF que por si só seja biologicamente inactivo/de actividade limitada) da proteína de fusão só se torna biologicamente activo após ligação a células que expressam a estrutura de superfície que é reconhecida pelo domínio de ligação de molécula de superfície celular. Assim, o domínio efector do polipéptido de acordo com o invento activa apenas o receptor correspondente a ele numa célula que tenha a estrutura de superfície correspondente ao módulo de ligação de molécula de superfície celular ou numa célula que seja adjacente a uma célula equipada com a estrutura de superfície. Por conseguinte, a proteína de fusão, mas não os seus componentes individuais (módulo 1 e módulo 2, respectivamente) e também não uma forma activa do domínio efector, activa selectivamente o receptor correspondente ao domínio efector nas células (ou células adjacentes a ele) que expressam a estrutura de superfície que é reconhecida pelo domínio de ligação de molécula de superfície celular. Esta nova propriedade (activação selectiva de receptor local) do polipéptido de acordo com o invento torna assim possível evitar os efeitos secundários sistémicos que são apresentados pelas citocinas TNF activas a partir das quais deriva o domínio efector de acordo com o invento, ou anticorpos agonistas conhecidos no estado da arte que activam o receptor correspondente. Por conseguinte, o polipéptido de acordo com o invento possibilita a manifestação de acção local alvo no organismo completo.

O domínio de ligação de molécula de superfície celular é vantajosamente seleccionado de modo a que a estrutura de superfície que é reconhecida por este esteja selectivamente presente ou, pelo menos, esteja enriquecida nas células, locais ou órgãos nos quais o domínio effector deva ser activo. Além disso, o domínio de ligação de molécula de superfície celular é seleccionado de modo a que não permita auto-activação da proteína de fusão, por exemplo, por agregação.

Os membros da família de ligandos TNF, por exemplo, TNF (Tumour Necrosis Factor - Factor de Necrose de Tumores; No. de acesso no GenBank NM\_000594), por exemplo TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand - Ligando Indutor de Apoptose Relacionada com TNF; No. de acesso no GenBank U37518), também denominado Apo2L, por exemplo CD40L (No. de acesso no GenBank NM\_011616) e, por exemplo, FasL (No. de acesso no GenBank U11821) têm actividade apoptótica e/ou reguladora do sistema imune. Para além de algumas excepções, os membros da família de ligandos TNF são proteínas de membrana tipo II. No entanto, em muitos casos podem também ser derivadas destas formas na membrana, formas solúveis, por proteólise ou corte alternativo, específicos. Em particular, as formas solúveis podem também ser produzidas por métodos de engenharia genética. No entanto, os membros solúveis e também na membrana da família de ligandos TNF manifestam a sua acção biológica por interacção com os membros de uma família correspondente de receptores - os membros da família de receptores TNF. Em muitos casos, as formas solúveis e na membrana da família de ligandos TNF podem diferir consideravelmente na sua actividade biológica. Assim, por exemplo, o TNF solúvel é um activador muito forte de TNF-R1, mas tem apenas acção muito restrita ou nenhuma acção no TNF-R2. Por outro lado, a forma na membrana do mesmo ligando pode activar os dois receptores TNF igualmente bem. Exemplos adicionais nos quais diferem as formas solúveis e na membrana de membros da família de ligandos de receptor TNF são, *inter alia*, FasL, CD40L e TRAIL.

De acordo com o invento, por variante quer-se dizer, em geral, sequências que têm, pelo menos, 80% da sequência nativa e diferem da sequência nativa, por exemplo, por deleção(ões), inserção(ões) e/ou, pelo menos, uma mutação.

Aqui, prefere-se uma homologia de sequência de, pelo menos, 90%, de preferência, pelo menos, 95% e, mais preferivelmente, pelo menos 97% com a correspondente sequência nativa. Um fragmento funcional pode ter sequências N-terminal, C-terminal ou intra-sequencialmente reduzidas das formas solúveis dos membros da família de ligandos de receptor TNF. As variantes biologicamente activas destes fragmentos são também descritas de acordo com o invento. As variantes derivadas no sentido do invento têm, de preferência, propriedades de ligação a receptor selectivas podendo ser optimizadas, por exemplo, no que se refere à sua actividade biológica específica ou a outras propriedades (estabilidade).

O princípio de acção das construções de acordo com o invento é aplicável em particular para todos os membros da família de ligandos de receptor TNF que são eficazes exclusivamente para certos receptores ou numa extensão particularmente boa como moléculas de membrana. Tal como FasL, CD40L estes incluem também TNF, TRAIL, 41BB, CD30L e Ox40L. Por conseguinte, são particularmente preferidos no módulo 1 (segmento (3)) dos polipéptidos de acordo com o invento aqueles membros da família de ligandos de receptor TNF que activam naturalmente o seu receptor complementar apenas como uma proteína de membrana.

Muito especialmente preferido como segmento (3) é um domínio extracelular solúvel de TRAIL, FasL, CD40, 41BBL, CD30L, Ox40L ou TNF.

O segmento ligante (2) entre os segmentos (1) (domínio de ligação de molécula de superfície celular; módulo 2) e (3) (fragmento de ligando de receptor TNF; módulo 1) nas construções de polipéptido de acordo com o invento é, de preferência, por exemplo, uma ligação flexível, mas, de preferência, sem influenciar adversamente as propriedades de trimerização intrínseca do fragmento de ligando de receptor TNF em questão (módulo 1), como mostrado abaixo nas construções (A) e (B) de exemplo.

No segmento (2), é possível uma qualquer sequência de péptidos que ocorra naturalmente ou seja sinteticamente preparada. Em princípio, pode ser adequado, um ligante de uma

sequência nativa ou variada (em parte) de todos os organismos, de preferência, de vertebrados, em particular de mamíferos, acima de tudo do homem. Adicionalmente, são adequados como ligantes, por exemplo, todos os segmentos de sequências de proteínas que originem trímeros por desenvolvimento de estruturas supersecundárias. Em todos os casos, as sequências de polipéptidos nativos ou fragmentos destes polipéptidos nativos que são utilizadas como ligantes no segmento (2) de um polipéptido de acordo com o invento, podem também ocorrer na forma de variantes biologicamente activas da mesma no sentido deste invento e de acordo com a definição acima.

O domínio de ligação de molécula de superfície celular (segmento (1)) do polipéptido do presente invento pode compreender, por exemplo, o segmento de um receptor para um ligando na membrana necessário para a interacção específica com a molécula de superfície celular. No entanto, são preferidos no contexto do presente invento, aqueles polipéptidos que têm um domínio de ligação de ligando solúvel de um receptor, em particular de um membro da família de receptores TNF. Aqui, o componente receptor não tem que ser complementar ao fragmento de ligando de receptor TNF presente no segmento (3).

De acordo com uma outra concretização preferida do polipéptido, o segmento (1) compreende, pelo menos, o segmento de um ligando de um receptor na membrana necessário para a interacção específica com a molécula de superfície celular. Por conseguinte, os ligandos ou péptidos solúveis que reconhecem receptores nas células são adequados de acordo com o invento. Os fragmentos de ligando de receptor TNF difentes do segmento (3) (módulo 1) são também adequados. Aqui, um polipéptido de acordo com o invento é particularmente preferido quando o segmento (1) é um fragmento de ligando/receptor solúvel de um mamífero, em particular de origem humana, e interage especificamente com estruturas alvo complementarmente definidas em células e tecidos de mamíferos, em particular humanos.

O segmento (1) de um polipéptido de acordo com o invento vai, de preferência, exhibir especificidade para uma proteína

de superfície celular selectiva ou predominantemente expressa no tecido de tumor ou em células activadas do sistema imune (por exemplo, células T, células B, macrófagos, células dendríticas). Exemplos de tais proteínas de superfície celular selectivas ou predominantemente expressas que podem ser ligadas pelo segmento (1) de um polipéptido de acordo com o invento estão em tecidos de tumor, tais como o VEGFR ou o complexo VEGFR/VEGF, todas formas mutadas e de tipo selvagem da família de receptores EGF ou CD30, em células T activadas, por exemplo, CD40L ou no receptor IL2, em células B, por exemplo, Baff-R ou CD40, em macrófagos, por exemplo, TNF de membrana ou no ligando B7 e em células dendríticas, por exemplo, tal como o ligando B7.

Por conseguinte, as hormonas de proteína ou péptido, por exemplo, factores de crescimento tal como EGF, e factores de angiogénese tal como VEGF, e também os domínios extracelulares solúveis de receptores tais como, por exemplo, todos os membros da superfamília de receptores TNF, em particular, TNF-R2, CD30 e CD40, e de outros receptores, por exemplo, CD28, mostraram ser preferidos para segmento (1) de um polipéptido de acordo com o invento.

Assim, um polipéptido preferido de acordo com o invento é uma proteína de fusão recombinante que em princípio contém os seguintes elementos estruturais (monómeros) numa sequência definida: segmento (1), por exemplo, N-terminalmente, um ligando ou fragmento receptor ou péptido; segmento (2), uma sequência de ligação; segmento (3), por exemplo, C-terminalmente, o domínio extracelular humano de FasL ou de TNF ou de CD40L. Analogamente, por exemplo, CD30L, Ox40L ou outros membros da família TNF podem servir como segmento (3) em polipéptidos correspondentes de acordo com o invento.

Um outro objecto do presente invento são ácidos nucleicos com sequências nucleotídicas (em particular sequências de ADN) que codificam proteínas de fusão da natureza acima mencionada de acordo com o invento (construções de ácidos nucleicos) ou contêm uma tal região que codifica um polipéptido de acordo com o invento. Tais construções de ácidos nucleicos são, de preferência, expressas em vectores de expressão. Os vectores

correspondentes que contêm uma sequência de ADN para as proteínas de fusão de acordo com o invento são assim também objectos do presente invento. De preferência, os vectores de acordo com o invento têm a capacidade de expressão e/ou amplificação numa célula procariótica e/ou eucariótica. Em particular, o presente invento refere-se também a vectores retrovirais e a todos os sistemas de vectores que são utilizados em terapêutica genética, por exemplo, também sistemas de vectores adenovirais. Por conseguinte, no contexto do presente invento, os procedimentos de terapêutica genética com os vectores ou construções de ácidos nucleicos de acordo com o invento são também descritos como métodos de tratamento para as indicações médicas descritas de acordo com o invento.

Um outro objecto do presente invento são as células hospedeiras que são transfectadas com ácidos nucleicos que codificam as proteínas de fusão de acordo com o invento. Neste contexto, as células hospedeiras que são transfectadas com vectores de expressão de acordo com o invento ou construções de ácidos nucleicos de acordo com o invento, em que os vectores de expressão por seu lado contêm sequências de ADN que codificam proteínas de fusão de acordo com o invento, são particularmente preferidas.

Um outro objecto do presente invento são processos para a produção (expressão e isolamento) de polipéptidos de acordo com o invento, em que um processo de isolamento de acordo com o invento é tipicamente caracterizado por (a) fornecimento de um vector ou de uma construção de ácidos nucleicos de acordo com o invento, (b) transfecção de células com um vector ou construção de ácidos nucleicos obtidos de acordo com o passo (a) do processo, (c) cultura das células transfectadas de acordo com (b) e (d) isolamento dos polipéptidos de acordo com o invento expressos sob condições adequadas a partir das células hospedeiras e/ou do sobrenadante de cultura. Aqui, a expressão da proteína de fusão é tipicamente efectuada de acordo com o estado da arte em sistemas de expressão adequados, de preferência, como um produto segregado de transfectantes estáveis, por exemplo, células CHO ou noutras células animais tais como Cos7 ou SF9 (células de insecto) ou outros sistemas de células eucarióticas, em particular, em

leveduras, por exemplo, *Pichia pastoris*. De preferência, os polipéptidos expressos de acordo com o invento têm sequências de comando relevantes adequadas para secreção no sistema de células. Por conseguinte, os vectores de acordo com o invento utilizados para expressão vão também conter sequências de codificação que codificam uma sequência de comando funcional.

Os polipéptidos de acordo com o invento, e quando adequado também as construções de ácidos nucleicos, vectores ou células hospedeiras (aqui sumarizadas sob a categoria "substâncias de acordo com o invento" ou "objectos de acordo com o invento") são também possíveis como fármacos ou para a produção de um fármaco. Eles podem ser utilizados, em particular, quando as substâncias de acordo com o invento, após ligação da proteína de fusão através do seu módulo 2 (segmento (1)) a uma molécula alvo na membrana específica (célula) se destinam a manifestar acção biológica através do receptor correspondente do fragmento de ligando de receptor TNF de acordo com o módulo 1 (segmento (3)). Por selecção adequada do módulo 2, a actividade de ligando de receptor TNF da substância de acordo com o invento é dirigida para o tecido a ser tratado ou o tipo de célula a ser tratado podendo ser produzido um agente terapêutico adaptado/optimizado para a indicação em questão.

Após administração *in vivo*, por exemplo, durante a utilização como um agente terapêutico de tumores, em particular para o tratamento de tumores sólidos, e também tumores linfáticos (benignos ou malignos), um polipéptido de acordo com o invento é primeira e especificamente ligado pelo domínio de ligação de molécula de superfície celular (módulo 2) na própria área do tumor ou no estroma de tumor reactivo/sistema vascular de tumor e assim activado. Os receptores correspondentes ao fragmento de ligando de receptor TNF (módulo 1) podem então ser activados e, por exemplo, induzir apoptose (módulo 1, por exemplo, fragmento solúvel de FasL ou TRAIL) ou activar células T infiltrantes (módulo 1, por exemplo, fragmento solúvel de CD40L). Após administração *in vivo*, por exemplo, durante a utilização como um agente terapêutico em doenças autoimunes, um polipéptido de acordo com o invento fica primeiramente ligado pelo domínio de ligação de molécula de superfície celular (módulo

2) a um marcador de superfície de células T activadas (por exemplo, CD40L) ou macrófagos activados (por exemplo, TNF de membrana) ficando assim biológica e completamente activo. Os receptores correspondentes ao fragmento de ligando de receptor TNF (módulo 1) podem então ser activados e, por exemplo, induzir apoptose (módulo 1, por exemplo, fragmento solúvel de FasL ou TRAIL).

No entanto, em princípio, a utilização de substâncias de acordo com o invento é também sempre desejável para utilização no campo terapêutico se for para desencadear a activação de uma cadeia de transdução de sinal, por exemplo, as cascatas de sinal desencadeadas pela família de receptores TNF, por exemplo, uma cascata de sinal apoptótico. Assim, a utilização de substâncias de acordo com o invento no tratamento ou para a produção de um fármaco para o tratamento de todas as doenças hiperproliferativas é uma possibilidade, por exemplo, também para eliminação alvo de células do sistema imune em reacções imunes excessivas, por exemplo, em doenças autoimunes, tais como por exemplo, esclerose múltipla, artrite reumatóide, diabetes mellitus e TEN, ou em reacções imunes aberrantes contra antigénios estranhos tal como pode ocorrer, por exemplo, em doenças infecciosas (bacterianas (por exemplo, devidas a micobactérias), virais ou por protozoários). É também uma possibilidade, o tratamento de doenças metabólicas ou condições hiperinflamatórias gerais, em particular inflamação crónica, por exemplo, também em alergias, e também no tratamento de reacções de rejeição pelo sistema imune do doente contra tecido estranho. Nos casos acima mencionados, o domínio de ligação de molécula de superfície celular (módulo 2), i.e. o segmento (1) de um polipéptido de acordo com o invento deve em cada caso reconhecer marcadores característicos na superfície das células alvo, nos quais é, de preferência, desencadeada uma cascata de sinal apoptótico com a finalidade de morte celular. Assim, por exemplo, no caso do tratamento após transplante de tecido estranho, as células endógenas do sistema imune do doente transplantado responsáveis pela reacção de rejeição vão servir como células alvo. Assim, por exemplo, no caso do tratamento da artrite reumatóide, os macrófagos activados endógenos que contribuem substancialmente para a doença vão servir como células alvo.

Os objectos de acordo com o invento, tais como construções de ácidos nucleicos, vectores de expressão ou células hospedeiras - como acima referido - têm também hipótese como fármacos, por exemplo, no tratamento das doenças acima mencionadas. Neste caso, as células a serem transfectadas são, de preferência, removidas do doente a ser tratado, são transfectadas *in vitro* com vectores de expressão de acordo com o invento, cultivadas e depois transferidas para o doente como um retransplante. A transfecção é realizada, de preferência por meio de construções de ácidos nucleicos ou vectores de expressão de acordo com o invento que associam a expressão a um promotor controlável. Os autotransplantes transfectados podem ser administrados localmente, por exemplo, injectados, dependendo da doença específica e das células alvo específicas. A administração local é, por exemplo, preferida no caso da terapêutica de tumores. Nesta, as células de tumores são removidas do doente, transfectadas *in vitro* e depois, de preferência, directamente injectadas no tumor. Este procedimento é adequado por exemplo, para o tratamento de tumores da pele (por exemplo, melanomas), tumores do sistema nervoso (por exemplo glioblastomas), etc.

Um outro objecto do presente invento é uma composição farmacêutica contendo polipéptidos de acordo com o invento, construções de ácidos nucleicos de acordo com o invento, vectores de acordo com o invento e/ou células hospedeiras de acordo com o invento e substâncias auxiliares, aditivas e/ou de veículo (por exemplo, também solubilizantes) farmacêuticamente inofensivas. Assim, de acordo com o invento é descrita uma combinação de substâncias de acordo com o invento com substâncias de veículo, auxiliares e/ou aditivas farmacêuticamente aceitáveis. As vias de produção adequadas estão descritas em "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980). Para administração parentérica são, por exemplo, possíveis como veículos, água estéril, soluções salinas estéreis, polialquilenoglicóis, naftaleno hidrogenado e, em particular polímeros láctido, copolímeros láctido/glicólido ou copolímeros polioxietileno/polioxipropileno biocompatíveis. Tais composições de acordo com o invento são possíveis para todas as indicações médicas acima descritas.

Em princípio, no contexto do presente invento, são descritas todas as vias de administração conhecidas na arte para as substâncias de acordo com o invento ou as composições de acordo com o invento. De preferência, a administração de um fármaco para o tratamento das doenças ou desordens anteriormente mencionadas é efectuada pela via de administração parentérica, i.e. por exemplo, subcutânea, intramuscular ou intravenosa ou oral ou intranasal. Tipicamente, as composições farmacêuticas de acordo com o invento vão ser sólidas, líquidas ou aerossóis (por exemplo, formuladas como pulverizadores). No entanto, a forma da composição será modificável dependendo da natureza da apresentação.

Em resumo, pode-se afirmar que de acordo com o invento, são proporcionadas proteínas de fusão duplas específicas com propriedades pró-apoptóticas e imunomoduladoras, que contêm, *a priori*, fragmentos solúveis de ligandos de receptor TNF na membrana que são inactivos/de actividade restrita, que podem, no entanto, ser activados localmente por ligação a estruturas de superfície celular que não interajam com o fragmento de ligando de receptor TNF. O domínio de ligação de molécula de superfície celular pode ele próprio ser uma segunda citocina, um receptor para ligandos na membrana ou um outro péptido de não anticorpo (ou um seu fragmento) que entra em ligação específica com as estruturas de membrana celular. Através deste domínio de ligação de molécula de superfície celular, a actividade de ligando de receptor TNF é dirigida para o tecido a ser tratado ou para os tipos de células a serem tratados, podendo-se produzir um agente terapêutico adaptado/otimizado para a indicação particular. Assim, no global a selectividade da acção de ligando de receptor TNF é alcançada com os presentes polipéptidos de acordo com o invento através de dois mecanismos: por um lado, através do enriquecimento da proteína de fusão que é inactiva ou de actividade restrita no estado não ligado mediado pelo domínio de ligação de molécula de superfície celular e de forma mais importante através da sua activação pela ligação da molécula de superfície celular, i.e. imobilização.

O presente invento é ilustrado com mais detalhe pelos diagramas seguintes.

Na Fig.1, são apresentados os resultados dos estudos relacionados com a indução de apoptose preferencial pelas proteínas de fusão de acordo com o invento, no caso de células positivas a CD40L. De forma a ser facilmente capaz de detectar a expressão de CD40L, a proteína fluorescente amarela YFP foi fundida no domínio intracelular de CD40L.

A Fig.1A apresenta a expressão da proteína de fusão CD40L-YFP em células KB e HT1080 parentais e transfectantes derivados destas que expressam estavelmente CD40L-YFP, utilizando análise FACS. Obtém-se também uma figura correspondente por análise FACS com anticorpos que reconhecem o domínio extracelular de CD40L (dados não apresentados).

As Figs.1B a 1D apresentam, respectivamente, um gráfico da viabilidade de células (em %) contra a concentração da respectiva proteína de fusão referida. As curvas no gráfico reproduzem os resultados do tratamento de células HT1080 e KB positivas a CD40L (HT1080-CD40L, KB-CD40L) ou negativas a CD40L com as construções CD40ex-Flag-FasLex e CD40ex-Flag-TRAILex.

Nas experiências de acordo com a Fig.1B, as células HT1080 e HT1080-CD40L-YFP (diagrama da esquerda) e as células KB e KB-CD40L-YFP (diagrama da direita) foram respectivamente cultivadas durante a noite numa placa de cultura de células com 96 cavidades. No dia seguinte, as células foram estimuladas com as concentrações referidas de CD40ex-Flag-FasLex. Em paralelo, para sensibilização da indução de apoptose, as células foram tratadas com CHX (2,5 µg/ml). No dia seguinte, determinou-se a vitalidade das células por coloração com violeta de cristal.

Nas experiências de acordo com a Fig.1C, as células HT1080 e HT1080-CD40L-YFP foram cultivadas durante a noite numa placa de cultura de células com 96 cavidades. No dia seguinte, as células foram estimuladas com as concentrações referidas de CD40ex-Flag-TRAILex. Caso contrário, utilizou-se o procedimento descrito na Fig.1B.

Na Fig.1D, por exemplo, mostra-se que a morte celular induzida em células HT1080 que expressam CD40L por CD40ex-

Flag-FasLex é mediada por Fas. De novo, as células HT1080-CD40L-YFP foram cultivadas durante a noite numa placa de cultura de células com 96 cavidades. No dia seguinte, as células foram estimuladas com 100 ng/ml de CD40ex-Flag-FasLex. Quando referido, o reagente CD40ex-Flag-FasLex foi antecipadamente pré-incubado com 2 µg/ml de Fas-Fc ou Fas-Comp, respectivamente. Caso contrário, utilizou-se o procedimento descrito na Fig.1B ou 1C, respectivamente. Mascaramento o conteúdo de FasL em CD40ex-Flag-FasLex com os reagentes solúveis de ligação a FasL Fas-Fc e Fas-Comp, a indução de apoptose em células positivas a CD40L podia ser parcial ou completamente bloqueada, respectivamente.

O presente invento é ilustrado com mais detalhe pelos exemplos práticos seguintes.

#### Exemplo 1

Construção dos polipéptidos de acordo com o invento CD40ex-Flag-FasLex e CD40ex-Flag-TRAILex.

#### **Construção (A): CD40ex-Flag-FasLex**

NH<sub>2</sub>-[CD40(1-192)]-[Ligante com marca flag]-[FasL(139-281)]-COOH

CD40(1-192):	domínio extracelular de receptor CD40 humano incluindo a sequência de comando (AA 1-192)
Ligante 1:	ligante com epítipo flag (tipo negrito) GSDYKDDDDKEFGRGDSPGRGDSP
FasL(139-281):	domínio extracelular de FasL humano (AA 139-281)

#### **Construção (B): CD40ex-Flag-TRAILex**

NH<sub>2</sub>-[CD40(1-192)]-[Ligante=marca flag]-[TRAIL(95-281)]-COOH

CD40(1-192):	domínio extracelular de receptor CD40 humano incluindo a sequência de comando (AA 1-192)
Ligante 1:	ligante com epítipo flag (tipo negrito) GSDYKDDDDKEF
TRAIL(95-281):	domínio extracelular de TRAIL humano (AA 95-281)

As proteínas de fusão foram preparadas como se segue:

**CD40ex-Flag-FasLex:**

1. O ADNc correspondente ao domínio extracelular do receptor CD40 (aminoácidos 1-192 incluindo a sequência de comando) foi amplificado por PCR de "leitura de prova" ("proof-reading") a partir de um grupo de ADNc de células B activadas. Durante isto, por meio dos iniciadores utilizados (No.1160 e No.1161), inseriu-se um sítio de clivagem Hind3 na extremidade 5' do amplicão e um sítio de clivagem BamH1 na extremidade 3'. O amplicão digerido com Hind3 e BamH1 foi então introduzido no vector de expressão eucariótica pCR3 (Invitrogen) similarmente digerido com Hind3 e BamH1.

2. O ADNc correspondente ao domínio extracelular do FasL (aminoácidos 139-281) foi amplificado por PCR de "leitura de prova" a partir de um grupo de ADNc de células T activadas. Durante isto, por meio dos iniciadores utilizados (No.1160 e No.1161), inseriu-se um sítio de clivagem EcoR1 na extremidade 5' do amplicão e um sítio de clivagem Xho1 na extremidade 3'. Adicionalmente, por meio do iniciador anterior, introduziram-se seis aminoácidos como ligante. O amplicão digerido com EcoR1 e Xho1 foi então introduzido no produto intermédio que foi obtido em 1., similarmente digerido com EcoR1 e Xho1.

3. Finalmente, para fins analíticos, inseriu-se uma marca flag por meio de oligonucleótidos de ligação entre o sítio de clivagem BamH1 e EcoR1 do produto intermédio obtido em 2. A construção assim obtida (pCR3-CD40ex-Flag-FasLex) codifica uma proteína de fusão com o domínio extracelular da molécula CD40 e o domínio extracelular do ligando Fas, que são ligados por uma marca flag e alguns outros AA.

**CD40ex-Flag-TRAILex:**

1. O ADNc correspondente ao domínio extracelular de TRAIL (aminoácidos 95-281) foi amplificado por PCR de "leitura de prova" a partir de um grupo de ADNc de células T activadas. Para isto, por meio dos iniciadores utilizados (No.1302 e No.1334), inseriu-se um sítio de clivagem EcoR1 na

extremidade 5' do amplicão e um sítio de clivagem Xba1 na extremidade 3'. O amplicão digerido com EcoR1 e Xba1 foi então introduzido no vector de expressão pCR3-CD40ex-Flag-FasL-ex similarmente digerido com EcoR1 e Xba1. Antes da ligação, removeu-se o fragmento FasL libertado a partir de pCR3-CD40ex-Flag-FasL-ex por digestão. A construção assim obtida (pCR3-CD40ex-Flag-TRAILex) codifica uma proteína de fusão com o domínio extracelular da molécula CD40 e o domínio extracelular da molécula TRAIL que são ligados por uma marca flag e alguns outros aminoácidos (AA).

Para obter CD40ex-Flag-FasLex e CD40ex-Flag-TRAILex, as células HEK293 ou Cos7 foram transfectadas com as construções acima descritas com lipofectamina (Gibco-BRL) de acordo com as instruções do fabricante. 48-96 horas após transfecção, os sobrenadantes de proteína de fusão foram filtrados por esterilização e armazenados a 4°C até posterior utilização.

Todos os passos de clonagem e amplificação por PCR foram realizados por procedimentos padrão normais com os iniciadores seguintes. Todas as construções foram sequenciadas para verificação da sequência de ADNc.

Iniciador 1106

5' CCG GAA TTC GGC CGG GGC GAC TCA CCC GGC CGG GGC GAC TCA  
CCC GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC 3'

Iniciador 1107

5' CCG CTC GAG GTG CTT CTC TTA GAG CTT ATA TAA GCC G 3'

Iniciador 1160

5' CCC AAG CTT CTC GCC ATG GTT CGT CTG CCT CTG CAG 3'

Iniciador 1161

5' CGC GGA TCC CAG CCG ATC CTG GGG ACC ACA GAC 3'

Iniciador 1302

5' CCG GAA TTC TAC GCA TAT TAC ACC TCT GAG GAA ACC ATT TCT  
ACA G 3'

Iniciador 1334

5' TGC TCT AGA CCA GGT CAG TTA GCC AAC TAA AAA GGC 3'

Exemplo 2

Demonstração da activação dependente de CD40L de CD40ex-Flag-FasLex e CD40ex-Flag-TRAILex no caso de células que expressam CD40L (ver também Fig. 1A).

CD40ex-Flag-FasLex e CD40ex-Flag-TRAILex foram preparados como descrito no exemplo 1. As células que expressam CD40L (HT1080-CD40L; KB-CD40L-YFP) e negativas a CD40L (HT1080; KB) foram cultivadas durante a noite em placas de cultura de células com 96 cavidades. No dia seguinte, as células foram incubadas com as concentrações indicadas de CD40ex-Flag-FasLex e CD40ex-Flag-TRAILex durante 8 h na presença de CHX (2,5 µg/ml). As células sobreviventes foram quantificadas por coloração com violeta de cristal.

**LISTA DE SEQUÊNCIAS****REQUERENTE**

1. NOME: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier  
RUA: Seehausstraße 7  
CIDADE: Tiefenbronn  
CÓDIGO POSTAL: 75233  
TELEFONE: 07 11/6 85 69 86  
TELEFAX: 07 11/6 85 74 84

2. NOME: PD. Dr. Harald Wajant  
RUA: Sonnenbühl 2  
CIDADE: Leinfelden-Echterdingen  
CÓDIGO POSTAL: 70771  
TELEFONE: 07 11/6 85 69 86  
TELEFAX: 07 11/6 85 74 46

**TÍTULO DO INVENTO:** Activação local, selectiva, de membros da família de ligandos TNF de proteínas de fusão de ligando TNF não-anticorpo, sistemicamente inactivas

**NÚMERO DE SEQUÊNCIAS** 2 sequências de ADN  
2 sequências de proteínas

**FORMA DE LEITURA POR COMPUTADOR:**

TIPO DE MEIO: Disquete  
COMPUTADOR: PC  
SISTEMA OPERATIVO: MS DOS  
SOFTWARE: Windows NT

**Descrição da sequência 1:** Sequência de ADN de codificação (abaixo, apenas cadeia de ADN de codificação, nucleótidos (NT) 1-1080) e sequência de aminoácidos traduzida (acima, código de uma letra dos aminoácidos (AA) 1-359) de uma proteína de fusão do invento pelo exemplo de CD40ex-Flag-FasL (construção A).

1	M	V	R	L	P	L	Q	C	V	L	W	G	C	L	L	T	16
1	ATG	GTT	CGT	CTG	CCT	CTG	CAG	TGC	GTC	CTC	TGG	GGC	TGC	TTG	CTG	ACC	48
17	A	V	H	P	E	P	P	T	A	C	R	E	K	Q	Y	L	32
49	GCT	GTC	CAT	CCA	GAA	CCA	CCC	ACT	GCA	TGC	AGA	GAA	AAA	CAG	TAC	CTA	96
33	I	N	S	Q	C	C	S	L	C	Q	P	G	Q	K	L	V	48
97	ATA	AAC	AGT	CAG	TGC	TGT	TCT	TTG	TGC	CAG	CCA	GGA	CAG	AAA	CTG	GTG	144
49	S	D	C	T	E	F	T	E	T	E	C	L	P	C	G	E	64
145	AGT	GAC	TGC	ACA	GAG	TTC	ACT	GAA	ACG	GAA	TGC	CTT	CCT	TGC	GGT	GAA	192
65	S	E	F	L	D	T	W	N	R	E	T	H	C	H	Q	H	80
193	AGC	GAA	TTC	CTA	GAC	ACC	TGG	AAC	AGA	GAG	ACA	CAC	TGC	CAC	CAG	CAC	240
81	K	Y	C	D	P	N	L	G	L	R	V	Q	Q	K	G	T	96
241	AAA	TAC	TGC	GAC	CCC	AAC	CTA	GGG	CTT	CGG	GTC	CAG	CAG	AAG	GGC	ACC	288
97	S	E	T	D	T	I	C	T	C	E	E	G	W	H	C	T	112
289	TCA	GAA	ACA	GAC	ACC	ATC	TGC	ACC	TGT	GAA	GAA	GGC	TGG	CAC	TGT	ACG	336
113	S	E	A	C	E	S	C	V	L	H	R	S	C	S	P	G	128
337	AGT	GAG	GCC	TGT	GAG	AGC	TGT	GTC	CTG	CAC	CGC	TCA	TGC	TCG	CCC	GGC	384
129	F	G	V	K	Q	I	A	T	G	V	S	D	T	I	C	E	144
385	TTT	GGG	GTC	AAG	CAG	ATT	GCT	ACA	GGG	GTT	TCT	GAT	ACC	ATC	TGC	GAG	432
145	P	C	P	V	G	F	F	S	N	V	S	S	A	F	E	K	160
433	CCC	TGC	CCA	GTC	GGC	TTC	TCC	AAT	GTG	TCA	TCT	GCT	TTC	GAA	AAA	480	
161	C	H	P	W	T	S	C	E	T	K	D	L	V	V	Q	Q	176
481	TGT	CAC	CCT	TGG	ACA	AGC	TGT	GAG	ACC	AAA	GAC	CTG	GTT	GTG	CAA	CAG	528
177	A	G	T	N	K	T	D	V	V	C	G	P	Q	D	R	L	192
529	GCA	GGC	ACA	AAC	AAG	ACT	GAT	GTT	GTC	TGT	GGT	CCC	CAG	GAT	CGG	CTG	576
193	G	S	D	Y	K	D	D	D	D	K	E	F	G	R	G	D	208
577	GGA	TCC	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	GAA	TTC	GGC	CGG	GGC	GAC	624
209	S	P	G	R	G	D	S	P	E	K	K	E	L	R	K	V	224
625	TCA	CCC	GGC	CGG	GGC	GAC	TCA	CCC	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	672
225	A	H	L	T	G	K	S	N	S	R	S	M	P	L	E	W	240
673	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	720
241	E	D	T	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	256
721	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	768
257	G	G	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	272
769	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	816
273	V	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	L	P	L	S	H	K	288
817	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	864
289	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	M	E	304
865	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	912
305	G	K	M	M	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	A	R	S	320
913	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	960
321	S	Y	L	G	A	V	F	N	L	T	S	A	D	H	L	Y	336
961	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	1008
337	V	N	V	S	E	L	S	L	V	N	F	E	E	S	Q	T	352
1009	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	1056
353	F	F	G	L	Y	K	L	*									359
1057	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	TAA									1080

□

**Características da construção A:**

Sequência do domínio extracelular de CD40 (AA 1-192) incluindo a sequência de comando: NT 1-576, AA 1-192

Sequência do epítipo "Flag" contendo o ligante entre os domínios extracelulares de CD40 e FasL: NT 577-648, AA 193-216

Sequência do fragmento FasL humano (domínio extracelular, de AA 139-281 da molécula FasL humana que ocorre naturalmente): NT 649-1077, AA 217-359

Codão de paragem: NT 1078-1080.

**Descrição da sequência 2:** Sequência de ADN de codificação (abaixo, apenas cadeia de ADN de codificação, nucleótidos (NT) 1-1176) e sequência de aminoácidos traduzida (acima, código de uma letra dos aminoácidos (AA) 1-391) de uma proteína de fusão do invento pelo exemplo de CD40ex-Flag-TRAIL (construção B).

1	M	V	R	L	P	L	Q	C	V	L	W	G	C	L	L	T	16
1	ATG	GTT	CGT	CTG	CCT	CTG	CAG	TGC	GTC	CTC	TGG	GGC	TGC	TTG	CTG	ACC	48
17	A	V	H	P	E	P	P	T	A	C	R	E	K	Q	Y	L	32
49	GCT	GTC	CAT	CCA	GAA	CCA	CCC	ACT	GCA	TGC	AGA	GAA	AAA	CAG	TAC	CTA	96
33	I	N	S	Q	C	C	S	L	C	Q	P	G	Q	K	L	V	48
97	ATA	AAC	AGT	CAG	TGC	TGT	TCT	TTG	TGC	CAG	CCA	GGA	CAG	AAA	CTG	GTG	144
49	S	D	C	T	E	F	T	E	T	E	C	L	P	C	G	E	64
145	AGT	GAC	TGC	ACA	GAG	TTC	ACT	GAA	ACG	GAA	TGC	CTT	CCT	TGC	GGT	GAA	192
65	S	E	F	L	D	T	W	N	R	E	T	H	C	H	Q	H	80

193	AGC GAA TTC CTA GAC ACC TGG AAC AGA GAG ACA CAC TGC CAC CAG CAC	240
81	K Y C D P N L G L R V Q Q K G T	96
241	AAA TAC TGC GAC CCC AAC CTA GGG CTT CGG GTC CAG CAG AAG GGC ACC	288
97	S E T D T I C T C E E G W H C T	112
289	TCA GAA ACA GAC ACC ATC TGC ACC TGT GAA GAA GGC TGG CAC TGT ACG	336
113	S E A C E S C V L H R S C S P G	128
337	AGT GAG GCC TGT GAG AGC TGT GTC CTG CAC CGC TCA TGC TCG CCC GGC	384
129	F G V K Q I A T G V S D T I C E	144
385	TTT GGG GTC AAG CAG ATT GCT ACA GGG GTT TCT GAT ACC ATC TGC GAG	432
145	P C P V G F F S N V S S A F E K	160
433	CCC TGC CCA GTC GGC TTC TTC TCC AAT GTG TCA TCT GCT TTC GAA AAA	480
161	C H P W T S C E T K D L V V Q Q	176
481	TGT CAC CCT TGG ACA AGC TGT GAG ACC AAA GAC CTG GTT GTG CAA CAG	528
177	A G T N K T D V V C G P Q D R L	192
529	GCA GGC ACA AAC AAG ACT GAT GTT GTC TGT GGT CCC CAG GAT CGG CTG	576
193	G S D Y K D D D D K E F T S E E	208
577	GGA TCC GAT TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA GAA TTC ACC TCT GAG GAA	624
209	T I S T V Q E K Q Q N I S P L V	224
625	ACC ATT TCT ACA GTT CAA GAA AAG CAA CAA AAT ATT TCT CCC CTA GTG	672
225	R E R G P Q R V A A H I T G T R	240
673	AGA GAA AGA GGT CCT CAG AGA GTA GCA GCT CAC ATA ACT GGG ACC AGA	720
241	G R S N T L S S P N S K N E K A	256
721	GGA AGA AGC AAC ACA TTG TCT TCT CCA AAC TCC AAG AAT GAA AAG GCT	768
257	L G R K I N S W E S S R S G H S	272
769	CTG GGC CGC AAA ATA AAC TCC TGG GAA TCA TCA AGG AGT GGG CAT TCA	816
273	F L S N L H L R N G E L V I H E	288
817	TTC CTG AGC AAC TTG CAC TTG AGG AAT GGT GAA CTG GTC ATC CAT GAA	864
289	K G F Y Y I Y S Q T Y F R F Q E	304
865	AAA GGG TTT TAC TAC ATC TAT TCC CAA ACA TAC TTT CGA TTT CAG GAG	912
305	E I K E N T K N D K Q M V Q Y I	320
913	GAA ATA AAA GAA AAC ACA AAG AAC GAC AAA CAA ATG GTC CAA TAT ATT	960
321	Y K Y T S Y P D P I L L M K S A	336
961	TAC AAA TAC ACA AGT TAT CCT GAC CCT ATA TTG TTG ATG AAA AGT GCT	1008
337	R N S C W S K D A E Y G L Y S I	352
1009	AGA AAT AGT TGT TGG TCT AAA GAT GCA GAA TAT GGA CTC TAT TCC ATC	1056
353	Y Q G G I F E L K E N D R I F V	368
1057	TAT CAA GGG GGA ATA TTT GAG CTT AAG GAA AAT GAC AGA ATT TTT GTT	1104
369	S V T N E H L I D M D H E A S F	384
1105	TCT GTA ACA AAT GAG CAC TTG ATA GAC ATG GAC CAT GAA GCC AGT TTT	1152
385	F G A F L V G *	391
1153	TTC GGG GCC TTT TTA GTT GGC TAA	1176

### Características da construção B:

Sequência do domínio extracelular de CD40 (AA 1-192) incluindo a sequência de comando: NT 1-576, AA 1-192

Sequência do epítipo "Flag" contendo o ligante entre os domínios extracelulares de CD40 e TRAIL: NT 577-612, AA 193-204

Sequência do fragmento FasL humano (domínio extracelular, de AA 139-281 da molécula FasL humana que ocorre naturalmente): NT 613-1173, AA 205-391

Codão de paragem: NT 1174-1176.

Lisboa, 2011-07-19

### REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido compreendendo um segmento (1), que contém um domínio de ligação de molécula de superfície celular, não sendo o domínio de ligação de molécula de superfície celular derivado de uma imunoglobulina, um segmento (2), que é um péptido de ligação, e um segmento (3), que contém um fragmento de um membro da família de ligandos TNF que por si só é biologicamente inactivo/de actividade restrita, em que o fragmento no segmento (3) contém um domínio extracelular de um membro da família de ligandos TNF ou uma variante tendo, pelo menos, 80% de homologia de sequência à sequência nativa do domínio extracelular, e em que o fragmento no segmento (3) se torna biológica e completamente activo apenas quando o segmento (1) se liga à molécula de superfície celular.

2. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, no qual os segmentos (1) a (3) são dispostos do terminal-N ao terminal-C.

3. Polipéptido de acordo com a reivindicação 2, no qual o segmento (3) contém o domínio extracelular de TRAIL, FasL, TNF, 41 BBL, CD40L, CD30L ou Ox40L.

4. Polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, no qual o domínio de ligação de molécula de superfície celular se liga a uma proteína de membrana.

5. Polipéptido de acordo com a reivindicação 4, no qual o domínio de ligação de molécula de superfície celular compreende, pelo menos, o segmento de um ligando de um receptor na membrana que é necessário para a interacção específica com a molécula de superfície celular.

6. Polipéptido de acordo com a reivindicação 5, no qual o ligando é uma hormona de péptido ou proteína de ligação a receptor ou um fragmento de ligação a receptor de uma citocina.

7. Polipéptido de acordo com a reivindicação 6, no qual o fragmento de citocina é um fragmento de um membro da

família de ligandos TNF, com a condição de que o membro da família de ligandos TNF, a partir do qual derivam os segmentos (1) e (3), seja diferente.

8. Polipéptido de acordo com a reivindicação 6, no qual a hormona é seleccionada a partir do grupo constituído por factores de crescimento, especialmente EGF, e factores de angiogénese, especialmente VEGF.

9. Polipéptido de acordo com a reivindicação 4, no qual o domínio de ligação de molécula de superfície celular compreende, pelo menos, o segmento de um receptor para um ligando na membrana que é necessário para a interacção específica com a molécula de superfície celular, com a condição de o segmento de receptor não se ligar ao domínio extracelular do membro da família de ligandos TNF de acordo com o segmento (3).

10. Polipéptido de acordo com a reivindicação 9, no qual o receptor é seleccionado a partir da superfamília de receptores TNF.

11. Polipéptido de acordo com a reivindicação 9 ou 10, no qual o receptor é seleccionado a partir do grupo constituído por TNF-R2, CD30, CD40 e CD28.

12. Construção de ácidos nucleicos contendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de acordo com uma das reivindicações precedentes.

13. Vector contendo a construção de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 12.

14. Célula hospedeira contendo a construção de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 12 e/ou o vector de acordo com a reivindicação 13.

15. Processo para o isolamento de um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, no qual (a) é preparado um vector de acordo com a reivindicação 13 ou uma construção de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 12,

(b) as células são transfectadas com um vector ou construção de ácidos nucleicos obtidos de acordo com o passo (a) do processo,

(c) as células transfectadas de acordo com (b) são cultivadas, e

(d) os polipéptidos expressos sob condições adequadas são isolados a partir das células hospedeiras e/ou do sobrenadante de cultura.

16. Polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, construção de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 12, vector de acordo com a reivindicação 13 ou célula hospedeira de acordo com a reivindicação 14 como medicamento.

17. Polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, construção de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 12, vector de acordo com a reivindicação 13 ou célula hospedeira de acordo com a reivindicação 14 para utilização no tratamento de doenças cancerígenas, especialmente tumores sólidos ou linfáticos, doenças infecciosas, doenças metabólicas, estados inflamatórios e doenças autoimunes, especialmente doenças reumáticas/artríticas.

18. Composição farmacêutica contendo, pelo menos, um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 e/ou uma construção de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 12 e/ou um vector de acordo com a reivindicação 13 e/ou células hospedeiras de acordo com a reivindicação 14 e substâncias auxiliares, aditivos e/ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

19. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18 para utilização no tratamento de doenças cancerígenas, especialmente tumores sólidos ou linfáticos, doenças infecciosas, doenças metabólicas, estados inflamatórios e doenças autoimunes, especialmente doenças reumáticas/artríticas.

Lisboa, 2011-07-19

Figura 1

