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

(11) BR 112014012460-4 B1

(22) Data do Depósito: 21/11/2012

(45) Data de Concessão: 12/01/2021

(54) Título: PROTEÍNAS RECOMBINANTES

(51) Int.Cl.: A61K 39/385; C07K 14/435.

(30) Prioridade Unionista: 01/06/2012 US 61/654,401; 23/11/2011 US 61/563,128.

(73) Titular(es): BIOVEN 3 LIMITED.

(72) Inventor(es): KEITH ALAN CHARLTON; ERIK D'HONDT.

(86) Pedido PCT: PCT IB2012002876 de 21/11/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/076580 de 30/05/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/05/2014

(57) Resumo: PROTEÍNAS RECOMBINANTES. A presente invenção se refere a uma proteína recombinante compreendendo uma sequência de polipeptídeo e uma sequência que expressa pelo menos uma parte de um fator de crescimento ao longo da dita sequência de polipeptídeo, e a uma proteína recombinante compreendendo uma sequência de polipeptídeo e uma primeira sequência que expressa pelo menos uma porção de um antígeno de tumor ao longo da dita sequência de polipeptídeo. A presente invenção também se refere ao uso de uma proteína recombinante para a preparação de uma vacina para o tratamento de doenças crônicas. São revelados, ainda, um processo para a preparação de um a molécula multivalente e um processo para a preparação de uma formulação de vacina.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROTEÍNAS RECOMBINANTES".**

CAMPO

[001] A presente invenção refere-se ao campo de proteínas recombinantes para o uso no tratamento de doenças.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[002] O presente pedido de patente reivindica a prioridade do Pedido de Patente U.S. nº. de série 61/563.128 depositado em 23 de novembro de 2011 intitulado "PROTEÍNAS RECOMBINANTES SINTÉTICAS IMUNOGÊNICAS" e do Pedido de Patente U.S. nº. de série 61/654.401 depositado em 01 de junho de 2012 intitulado "PROTEÍNAS RECOMBINANTES SINTÉTICAS IMUNOGÊNICAS", ambos aqui incorporados a título de referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES

[003] A imunologia do câncer é o estudo das interações entre um sistema imunológico e células de câncer tais como tumores ou malignidades. A iniciação de uma resposta imunológica, tal como o reconhecimento de antígenos específicos do câncer, que são expressos por tumores humanos e não em tecidos normais, é de interesse particular. De modo geral, os métodos para controlar a divisão e a proliferação das células malignas consistem em isolar esses antígenos e apresentar os mesmos de modo que os mesmos sejam reconhecidos pelo sistema imunológico como não autoantígenos e induzam uma resposta imunológica específica.

[004] Há um número significativo de fatores de crescimento identificados atualmente, e foi mostrado que a sua maior parte, se não todos, consiste em mediadores importantes da proliferação de células em vários cânceres além de ser implicados em outras condições de doenças. De modo geral, os fatores de crescimento são as proteínas solúveis de soro que reconhecem, e são ligadas por um grupo de

receptores de fator de crescimento posicionados nas superfícies das células. Os fatores de crescimento particulares podem ser específicos para um único receptor, ou podem se ligar a mais de um receptor proximamente relacionado com afinidades variadas. Similarmente, alguns receptores ligam somente um único ligando de fator de crescimento, ao passo que outros podem se ligar a múltiplos fatores de crescimento relacionados, outra vez normalmente com afinidades diferentes. Com a ligação ao seu receptor natural, o domínio citoplásmico do receptor é fosforilado, e isto inicia uma cascata de sinalização intracelular que resulta na modulação de uma transcrição de um ou mais genes e finalmente à progressão através do ciclo de células e da proliferação de células.

[005] Os fatores de crescimento e seus receptores são componentes essenciais dos processos normais do crescimento, do desenvolvimento e do reparo, e seus perfis de distribuição do tecido e níveis de expressão regulam proximamente o crescimento das células. Numerosos estudos mostraram que os fatores de crescimento podem estimular a proliferação de uma variedade de tipos de células *in vitro* e *in vivo* (Cohen S., Carpenter G., PNAS USA 72, 1317, 1975, Witsch E *et al*: Physiology: 25(2):85-101, (2010)). Além disso, foi mostrado que determinados fatores de crescimento estimulam a proliferação em algumas linhagens de células do câncer, por exemplo, o fator de crescimento epidérmico (EGF) pode estimular algumas células de carcinoma do pulmão de células não pequenas (Osborne C. K. *et al.* Can Res. 40.2.361 (1980)). Outros fatores de crescimento tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) são importantes em diversas doenças da oncologia, tais como o câncer do pulmão de células não pequenas (NSCLC) (Ballas MS, Chachoua A., Onco Targets and Therapy: 4. 43-58

(2011)), Prostate Cancer, (Cox ME *et al*; Prostate Cancer 69 (1):33-40 (2009)), e câncer da mama (Law J *et al.*, Cancer Res; 68.24: 10238-10346 (2008)).

[006] Os níveis elevados de vários receptores do fator de crescimento foram relatados em tecidos malignos. Por exemplo, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) foi detectado em níveis raramente elevados em tumores malignos de origem epitelial, tais como cânceres do pulmão, da mama, da bexiga, do ovário, da vulva, do cólon, do pulmão, do cérebro e do esôfago. O papel desempenhado pelos fatores de crescimento e por seus receptores na regulação do crescimento de tumor é desconhecido, mas há sugestões que a expressão do receptor do fator de crescimento em células de tumor provê um mecanismo para a estimulação do crescimento autócrino que conduz à proliferação descontrolada (Schlessinger J., Schreiber A. B., Levi A., Liberman T., Varden Y. Crit. Rev. Biochem. 1983, 14 (2) 93-111). Além disso, Liao Y *et al*.; Hum Pathol 36(11): 1186-1196 (2005) e Cox ME et al; Prostate: 69(1) 33-40 (2009) descrevem o papel aumentado do receptor insular e fator de crescimento no câncer metastático da próstata.

[007] Uma estratégia do tratamento para visar a sinalização do fator de crescimento na terapia do câncer consiste no uso de uma imunoterapia passiva, tal como o uso de anticorpos monoclonais contra receptor/receptores particulares envolvidos. Tais estudos demonstraram que o reconhecimento específico por um anticorpo do receptor que pode inibir a ligação do ligando pode ter um efeito inibidor na estimulação mitogênica das células malignas (SATO J. D., *et al.* Methods in Enzymology, vol. 146, páginas 63-81, 1987). No entanto, os anticorpos que são de origem murina irão produzir normalmente uma resposta de anticorpo anticamundongo humano (HAMA), desse modo limitando os mesmos a uma única administração.

[008] Outras estratégias do tratamento consistem no uso de uma imunoterapia ativa com vacinas que contêm o fator de crescimento de interesse para induzir uma resposta imunológica contra a molécula para inibir o efeito da proliferação do fator de crescimento em tumores. A Patente U.S. nº. 5.984.018, concedida a Davila *et al.*, intitulada Composição de Vacina que Compreende Fator de crescimento Epidérmico Autólogo ou um Fragmento ou um Derivado do Mesmo que tem Atividade Antitumor e Seu Uso na Terapia de Doenças Malignas, apresenta, por exemplo, o uso de uma vacina que contém uma mistura de um fator de crescimento e uma proteína carreadora imunogênica (isto é, não humana) quimicamente conjugados entre si ao usar glutaraldeído. No entanto, sem ficar limitado a nenhuma teoria particular, acredita-se que a conjugação química impede respostas imunológicas contra a vacina.

[009] Esta é uma abordagem tecnicamente desafiadora, uma vez que requer que o hospedeiro gere uma resposta imunológica a um 'autoantígeno', e sistemas imunológicos de vertebrados evoluíram para impedir a ocorrência de tais respostas. Onde uma resposta imunológica forte é gerada contra um autoantígeno, por exemplo, um que inclui a ativação de células T auxiliares, normalmente um estado de doença autoimune. Por muitos anos foi teorizado que alguns distúrbios autoimunes, por exemplo, o lúpus, a esclerose múltiplo (MS), o diabetes, etc., podem ser causados pela exposição precoce a um agente ambiental que inclui epítopos imunogênicos (epítopos de células T) que imitam proximamente os autoepítopos hospedeiros. Isso pode conduzir à estimulação de células T auxiliares que são transversalmente reativas com epítopos hospedeiros. A exposição subsequente ao agente ambiental pode então resultar em uma resposta anti-autoimunológica (Albert, L. J., e Inman, R.D BNew England Journal Of Medicine, 30 de dezembro, páginas 2068-2074,

1999). Tem sido demonstrado desde então que um antígeno viral pode de fato gerar uma resposta anti-autoimunológica contra uma proteína de célula de nervo (Levin, M.C. *et al.*, Nature Medicine vol 8 (5) páginas 509-513, 2002).

[0010] A Publ. de Patente U.S. nº. 2006/0251654, concedida a Casimiro *et al.*, intitulada Método Para o Tratamento de Doenças Crônicas Malignas e infecciosas (a publicação '654) apresenta um método de tratamento de um indivíduo que é portador de uma doença crônica maligna ou infecciosa que compreende o método de imunização do indivíduo com uma vacina que contém um autoantígeno associado com a doença crônica maligna ou infecciosa que é acoplada a uma proteína carreadora; o tratamento do indivíduo com um agente imunomodulador; e a imunização do indivíduo outra vez com a vacina da etapa 1, e um adjuvante apropriado selecionado de hidróxido de alumínio e Montanide ISA 51 (Seppic, Paris, France). Infelizmente, acredita-se que a preparação da vacina pela conjugação química impede a resposta imunológica.

[0011] A maioria das vacinas descritas acima exibe um número de limitações, surgindo principalmente do método de fabricação e a falta potencial de uniformidade e homologia do produto de proteína. As vacinas descritas acima compreendem de modo geral uma mistura de uma proteína carreadora recombinante e polipeptídeos de origem humana que são quimicamente conjugados ao usar glutaraldeído. Infelizmente, esse reagente reativo pode formar de maneira indesejável ligações de reticulação covalentes entre variedades de grupos químicos, e de modo geral conduz a um produto altamente heterogêneo. Desse modo, as vacinas resultantes podem compreender não somente moléculas de proteína carreadora com números variados do polipeptídeo humano alvo (por exemplo, 0, 1, 2, 3, etc.) unidas, mas cada um dos polipeptídeos humanos pode ser

unido ao carreador através de átomos diferentes e desse modo em posições diferentes e em orientações diferentes. Além disso, ambas as moléculas de polipeptídeo e de proteína carreadora alvo podem ser conjugadas uma nas outras, o que resulta em vários homo-multímeros que não podem não ter nenhuma eficácia clínica e não podem contribuir para uma resposta imunológica do paciente anticâncer.

SUMÁRIO

[0012] A presente invenção refere-se a proteínas recombinantes e seus respectivos métodos de fabricação; à caracterização das proteínas recombinantes e dos métodos terapêutico de uso das proteínas recombinantes para o tratamento de doenças crônicas tais como, por exemplo, câncer do pulmão, da mama, da bexiga, da próstata, do ovário, da vulva, do cólon, colorretal, intestinal, pulmonar, do cérebro, do esôfago, outros cânceres, e outras doenças.

[0013] Em uma modalidade ilustrativa, a proteína recombinante é uma molécula de proteína imunogênica que expressa uma ou mais sequências que se desdobram em uma estrutura física, expressando, por exemplo, uma ou mais sequências de uma proteína da toxina B da cólera (CT - B) de *Vibrio cholera* ou um equivalente sintético, e expressa uma ou mais sequências de um ou mais epítopos de fatores de crescimento humanos. As expressões dos fatores de crescimento ou de partes dos mesmos podem estar presentes em múltiplos sítios, tais como um único antígeno, em tandem, e/ou cadeias mais longas de molécula(s) de antígeno por sítio.

[0014] Em uma outra modalidade ilustrativa, a proteína recombinante é uma molécula de proteína imunogênica que expressa uma ou mais sequências que se desdobram em uma estrutura física, por exemplo, expressando uma ou mais sequências de uma proteína de toxina B de cólera (CT-B) de *Vibrio cholera* ou um equivalente sintético, e expressa uma ou mais sequências de um ou mais

antígenos de tumor ou partes dos mesmos. A proteína recombinante também pode incluir uma ou mais sequências de um ou mais fatores de crescimento ou partes dos mesmos, e/ou uma ou mais sequências de um ou mais receptores ou partes dos mesmos.

[0015] Em uma outra modalidade ilustrativa, a proteína recombinante é uma molécula de proteína imunogênica que expressa uma ou mais sequências que se desdobram em uma estrutura física expressando, por exemplo, uma ou mais sequências de uma proteína de toxina B de cólera (CT - B) de *Vibrio cholera* ou um equivalente sintético, e expressa uma ou mais sequências de um ou mais receptores ou partes dos mesmos. A proteína recombinante também pode incluir uma ou mais sequências de um ou mais fatores de crescimento ou partes dos mesmos, e/ou uma ou mais sequências de um ou mais antígenos de tumor ou partes dos mesmos.

[0016] Nessas modalidades ilustrativas, as expressões do(s) antígeno(s) de tumor ou partes do(s) mesmo(s), do(s) receptor(es) ou partes do(s) mesmo(s), e/ou do(s) fator(es) do crescimento ou partes do(s) mesmo(s) podem estar presentes em múltiplos sítios, tais como um único antígeno ou receptor, em tandem, e/ou cadeias mais longas de molécula(s) de antígeno ou receptor por sítio.

[0017] Em uma modalidade ilustrativa, a sequência do antígeno de tumor pode incluir uma sequência de um Antígeno Específico da Próstata (PSA) ou parte do mesmo. Em uma modalidade ilustrativa, a sequência de receptor pode incluir uma sequência de um Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico humano (Her2) ou parte do mesmo e/ou um Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico humano (Her3) ou parte do mesmo.

[0018] Em uma modalidade ilustrativa, a sequência do fator de crescimento pode incluir uma sequência de um fator de crescimento epidérmico (EGF) ou de uma parte substancial da(s) região(ões) de

codificação apropriada(s) do EGF incluindo um domínio de neutralização do EGF em uma ou mais posições dentro da proteína recombinante. Em outras modalidades ilustrativas, a sequência do fator de crescimento pode incluir um comprimento total ou parte do mesmo de um ou mais dos seguintes fatores de crescimento, e/ou autoantígenos alternativos tais como, mas não limitados a, outros fatores de crescimento, incluindo, mas não limitados a, EGF, IGF-1, IGF-2, FGF, TGF-β, TGF-α, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PDGF, NGF, EGF, HGF, BMPs e ILs 1-6. Dentro do âmbito da invenção é contemplado que os fatores de crescimento podem ser selecionados de origens humanas e não humanas. Dentro do âmbito da invenção também é contemplado que a dita sequência de fatores de crescimento pode ser substancialmente similar ou a fatores de crescimento tanto humanos quanto não humanos ou a dita sequência pode conter partes funcionais dos mesmos. Além disso, a proteína recombinante pode incluir uma ou mais expressões de outras sequências que podem ser usadas para modelar funcionalmente uma parte ou todos os fatores de crescimento dentro de uma sequência de proteína imunogênica recombinante. Em uma modalidade, resíduos de flanqueio adicionais também podem ser expressos ou adicionados à sequência mínima para permitir que todo o domínio neutralizador da molécula seja apresentado em uma conformação natural e seja acessível às células do sistema imunológico.

[0019] No contexto da presente invenção, o "domínio neutralizador" é definido como uma região ou regiões do um ou outro ou de ambos os membros de um par de ligação específico, por exemplo, um fator de crescimento e seu receptor cognato, em que a ligação de uma terceira molécula que não é um membro do par de ligação específico à(s) região(ões) acima mencionada(s) irá impedir a ligação subsequente dos dois membros do par de ligação específico. A

terceira molécula pode ser uma outra molécula de proteína que inclui, mas sem ficar a ele limitada, um anticorpo, ou pode ser uma molécula que não de proteína pequena, e pode ser de origem natural ou sintética. O domínio neutralizador irá incluir normalmente as regiões dos membros do par de ligação específico que ficam em contato direto durante a ligação, e também vai incluir regiões fora-com as ditas regiões em que, com ligação de uma terceira molécula, introduz um impedimento esteárico suficiente para impedir que os membros do par de ligação específico se liguem diretamente.

[0020] É bem estabelecido no campo que o reconhecimento específico de um ligando por seu receptor cognato é definido por uma interação entre o sítio de ligação do receptor e uma assinatura molecular particular (epítopo) do ligando. Desse modo, um anticorpo que se liga ou então bloqueia o sítio de ligação do receptor, ou se liga a ou então bloqueia o epítopo de reconhecimento do ligando, irá impedir as interações entre o ligando e o receptor. Tais anticorpos são descritos como "neutralizadores". No contexto da presente invenção, é desejável que os anticorpos neutralizadores sejam gerados pelo hospedeiro com a administração da proteína recombinante, e desse modo a sequência de proteína pode expressar ou incluir um ou mais de todos, ou uma sequência apropriada derivada de um fator de crescimento ou antígeno de tumor de maneira tal que os epítopos requeridos para a ligação do receptor são apresentados em uma conformação (nativa) funcional.

[0021] Além de expressar cópias múltiplas de um único antígeno de tumor, receptor e/ou fator de crescimento, apresentados como um único antígeno de tumor, receptor, e/ou fator de crescimento ou parte dos mesmos por sítio físico, e/ou como cadeias de sequências de antígeno de tumor, receptor, e/ou fator de crescimento repetitivas (por exemplo, n = 1 ou mais); a proteína de acordo com a invenção

também pode incluir expressões de um ou mais epítopos ou sítios de ligação de dois ou mais antígenos de tumor, receptores, e/ou fatores de crescimento diferentes presentes individualmente ou como cadeias em posições diferentes dentro da sequência da proteína recombinante.

[0022] A proteína resultante pode ser um único polipeptídeo que expressa um antígeno de tumor, um receptor, e/ou um fator de crescimento ou um ou um mais epítopos ou sítios de ligação dos mesmos dentro da sequência da proteína recombinante. Em uma modalidade ilustrativa, a sequência da proteína recombinante expressa um ou mais partes de uma sequência de CT-B e apresenta a(s) expressão(ões) do antígeno de tumor, receptor e/ou fator de crescimento ou uma ou mais expressões de epítopos ou sítios de ligação dos mesmos em uma superfície da proteína recombinante em uma conformação natural.

[0023] Em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentado um processo de preparação de uma formulação de proteína. Nessa modalidade ilustrativa, o processo inclui a montagem de um ou mais monômeros monovalentes ou multivalentes individuais de uns nos outros e a preparação de uma vacina multivalente que inclui uma proteína recombinante que inclui um ou mais antígenos de tumor, receptor e/ou fator de crescimento ou partes dos mesmos.

[0024] Ainda em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentado um processo para o tratamento de um paciente. Nessa modalidade ilustrativa, o processo inclui a administração separada ao paciente de um ou mais antígeno de tumor, receptor e/ou fator de crescimento, monovalentes ou multivalentes, proteínas sintéticas em um mesmo dia ou em dias ou horários alternados durante um período de vacinação.

[0025] Em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentado um processo para o tratamento de um paciente. Nessa modalidade ilustrativa, o processo inclui a administração separada ao paciente de

uma ou mais vacinas, um antígeno de tumor, receptor e/ou fator de crescimento monovalentes ou multivalentes, proteínas sintéticas em um veículo farmaceuticamente aceitável que inclui um adjuvante para promover uma resposta imunológica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0026] As modalidades descritas na presente invenção são ilustradas nas figuras dos desenhos anexos, os quais se prestam como exemplificadores e não limitadores, nos quais as mesmas referências se prestam a indicar as partes idênticas ou correspondentes, e nos quais:

[0027] a Figura 1 ilustra uma tabela de sequências e estruturas de moléculas de EGF de uma gama de organismos;

[0028] a Figura 2 ilustra uma modalidade de uma estrutura de uma molécula humana de EGF, incluindo um domínio neutralizador de EGF;

[0029] a Figura 3 ilustra uma modalidade de uma estrutura de linha simplificada de pares de cisteína da molécula de EGF, incluindo o domínio neutralizador de EGF;

[0030] a Figura 4 ilustra uma modalidade de uma sequência mínima da molécula de EGF que apresenta o domínio neutralizador de EGF em uma conformação correta;

[0031] a Figura 5 ilustra uma modalidade de uma estrutura de uma molécula sintética modificada, expressando o domínio neutralizador de EGF;

[0032] a Figura 6 ilustra um gráfico de barras da ligação de mAb 10825 e mAb 10827 a rHuEGF com a densidade ótica (OD) medida a 450 nm;

[0033] a Figura 7 ilustra um gráfico de barras da ligação de mAb 10825 e mAb 10827 a rHuEGF em competição com um peptídeo solúvel livre derivado do domínio neutralizador;

[0034] a Figura 8 ilustra um gráfico de linha da ligação do domínio neutralizador anti-EGF mAb 10827 a 6 proteínas sintéticas EGF-CT-B adsorvidas diretamente em placas de ELISA;

[0035] a Figura 9 ilustra um gráfico de linha da ligação do domínio neutralizador anti-EGF mAb 10827 a 6 proteínas sintéticas EGF-CT-B capturadas por um anticorpo anti-CT-B de coelho;

[0036] a Figura 10 ilustra um Western Blot das 6 proteínas EGF-CT-B monovalentes aplicada em gel de SDS sob condições nativas (não fervidas), e detectadas com um anticorpo anti-CTB-B;

[0037] a Figura 11 ilustra um gráfico de linha da ligação do domínio neutralizador anti-EGF mAb 10827 às proteínas EGF-CT-B sintéticas incluindo 2 sequências de EGF de comprimento total (E2) ou duas sequências de EGF parciais (B2);

[0038] a Figura 12 ilustra um Western Blot das proteínas EGF-CT-B sintéticas bivalentes aplicadas em géis de SDS-PAGE não desnaturantes;

[0039] a Figura 13 ilustra uma sequência de proteína sintética que inclui duas sequências de EGF de comprimento total (sublinhadas) e uma sequência de CT-B (em itálico);

[0040] a Figura 14 ilustra uma sequência de proteína sintética que inclui duas sequências de domínio neutralizador de EGF (sublinhadas) e a sequência de CT-B (em itálico);

[0041] a Figura 15 ilustra uma sequência de proteína sintética que inclui duas sequências parciais da molécula de EGF que inclui o domínio neutralizador de EGF, Cys6 a Cys31, (sublinhado) e a sequência de CT-B (em itálico);

[0042] a Figura 16 ilustra um Western Blot que mostra o efeito da mudança do pH na multimerização da proteína de CT-B nativa. As amostras no lado direito do gel foram incubadas por 5 minutos ao pH indicado abaixo antes da análise do gel. As amostras no lado

esquerdo foram incubadas ao pH indicado abaixo por 5 min., e então neutralizadas de volta ao pH 7,0 por 1 hora antes da análise do gel;

[0043] a Figura 17 ilustra uma tabela de construções T1-T6, E2 e B2 incluindo as sequências que expressam EGF e CT-B;

[0044] a Figura 18 ilustra um Western Blot das construções de E2 e B2;

[0045] a Figura 19 ilustra as construções E2, E2N e E2C incluindo as sequências que expressam EGF e CT-B;

[0046] a Figura 20 ilustra as construções incluindo as sequências que expressam EGF e CT-B e que contêm ligantes de aminoácidos estendidos;

[0047] a Figura 21 ilustra um Western Blot das construções de E2, E2N e E2C;

[0048] a Figura 22 ilustra um Western Blot de um número de construções de N-terminal incluindo os ligante de aminoácidos estendidos; e

[0049] a Figura 23 ilustra um Western Blot de um número de construções de C-terminal incluindo os ligantes de aminoácidos estendidos.

[0050] A Figura 24 ilustra uma sequência de proteína sintética que inclui IGF1 (sublinhado), EGF (sublinhado e em itálico) e as sequências de CT-B (em itálico);

[0051] a Figura 25 ilustra um gráfico de barras de um ELISA de captura que demonstra a presença simultânea de sequências de IGF, EGF e CTB em uma única proteína recombinante. As barras A e B foram capturadas pelo anticorpo anti-EGF, e a barra C pelo anticorpo anti-IGF. As proteínas foram detectadas tal como segue: A anti-CTB, B anti-IGF e C anti-CTB;

[0052] a Figura 26 ilustra uma sequência de proteína sintética que inclui a sequência de Hu-IGF1 (sublinhada) e a sequência de CT-B

(em itálico);

[0053] a Figura 27 ilustra um gráfico de barras de um ELISA de captura em que os hetero-oligômeros de TGF-CTB e EGF-CTB são detectados. Todas as amostras incluem IGF do C-terminal de IGF a CTB. As amostras A e B incluem o C-terminal de EGF a CTB, e as amostras B e D incluem o N-terminal de EGF a CTB. As amostras A e B foram capturadas com um anticorpo anti-EGF, e IGF foi detectado, ao passo que as amostras C e D foram capturadas com um anticorpo anti-IGF e EGF foi detectado;

[0054] a Figura 28 (a-e) ilustra sequências de proteínas sintéticas incluindo a sequência de CT-B (em itálico) e as sequências do fator de crescimento (sublinhadas) de a) TGF-Beta1, b) FGF2, c) HGF (NK1), d) IGF1I2 e e) VEGF-A/C (sequência de VEGF-C sublinhada e em itálico);

[0055] a Figura 29 ilustra um gráfico de barras de um ELISA de captura de uma faixa diversa de proteínas recombinantes quiméricas incluindo as sequências derivadas de um ou mais fatores de crescimento junto com sequências de CTB. Em cada caso, a proteína recombinante foi capturada por um anticorpo específico para uma das sequências e detectada então com um anticorpo específico para uma sequência diferente tal como segue:

[0056] HGF e TGF B1 foram capturados com os anticorpos α-HGF e β–TGF B1, e CTB foi detectado;

[0057] FGF2 foi capturado com anticorpo de α-CTB e FGF2 foi detectado;

[0058] VEGF A/C foi capturado com (i) o anticorpo de α-VEGF-A e (ii) o anticorpo de α-VEGF-C, e CTB foi detectado em ambos os casos;

[0059] IGF1/2 foi capturado pelo anticorpo de α-IGF1 em ambos os casos, e detectado com (i) o anticorpo de α-CTB e (ii) o anticorpo de α-IGF2;

[0060] a Figura 30 ilustra um Western Blot de um gel de SDS-PAGE da proteína recombinante nativa de TGF B1-CTB de acordo com a figura 28a, demonstrando a presença da proteína recombinante principalmente pentamérica;

[0061] a Figura 31 ilustra uma sequência de proteína sintética que inclui a) uma sequência de proteína sintética que inclui a sequência de TGF-B1 (sublinhada) e a sequência de CT-B (em itálico) e b) a sequência de ligação do domínio do ligando do receptor de TGF-Beta2 (sublinhada) e a sequência de CT-B (em itálico);

[0062] a Figura 32 ilustra um gráfico de barras de um ELISA da captura da proteína recombinante que contém as sequências de TGF-Beta-R2 e CTB. O gráfico demonstra que ambas as sequências podem ser ligadas simultaneamente em ambas as orientações sem polarização;

[0063] a Figura 33 ilustra que a proteína recombinante que contém as sequências derivadas de TGF-beta e CTB pode se ligar à proteína recombinante que contém as sequências derivadas do domínio de ligação do ligando do receptor de TGF beta 2 e CTB;

[0064] a Figura 34 ilustra as respostas do anticorpo de IgG de soros dos camundongos do Grupo 1 a uma diluição de 1/100 para r-IGF depois da imunização;

[0065] a Figura 35 ilustra as respostas do anticorpo de IgG de soros dos camundongos do Grupo 2 a uma diluição de 1/100 para r-EGF depois da imunização;

[0066] a Figura 36 ilustra as respostas do anticorpo de IgG de soros dos camundongos do Grupo 3 a (a) uma diluição de 1/100 e (b) uma diluição de 1/8 para r-EGF depois da imunização;

[0067] a Figura 37 ilustra as respostas do anticorpo de IgG de soros dos camundongos do Grupo 3 a uma diluição de (a) 1/100 e de (b) 1/8 para r-IGF depois da imunização;

[0068] a Figura 38 ilustra as respostas do anticorpo de IgG de soros dos camundongos do Grupo 4 a uma diluição de (a) 1/100 e de (b) 1/8 para r-EGF depois da imunização;

[0069] a Figura 39 ilustra as respostas do anticorpo de IgG de soros dos camundongos do Grupo 4 a uma diluição de (a) 1/100 e de (b) 1/8 para r-IGF depois da imunização;

[0070] a Figura 40 ilustra as respostas do anticorpo de IgG de soros dos camundongos do Grupo 5 a uma diluição de 1/8 (exceto a amostra 178 a 1/100) para r-IGF depois da imunização;

[0071] a Figura 41 ilustra as respostas do anticorpo de IgG de soros dos camundongos do Grupo 6 a uma diluição de 1/100 a) para r-IGF e b) rHu-EGF depois da imunização;

[0072] a Figura 42 ilustra a estrutura de monogangliosídeo GM 1, a parelha de ligação natural da subunidade B de toxina de cólera;

[0073] a Figura 43 ilustra a estrutura de D-galactose comercialmente disponível conjugada a um suporte sólido (Pierce); e

[0074] a Figura 44 ilustra um gel de SDS-PAGE da purificação de rCTB do sobrenadante da cultura (meio) de três cepas de células de E. coli transformadas com um vetor de expressão de CTB tal como segue: A raia 1 mostra o padrão de peso molecular. As raias 2, 5 e 8 mostram o sobrenadante bruto da cultura. As raias 3, 6 e 9 mostram frações periplásmicas brutas. As raias 4, 7 e 10 mostram CTB purificado eluído. A raia 11 mostra CTB marcada com His purificado por IMAC.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0075] As modalidades detalhadas das presentes proteínas recombinantes ou vacinas são aqui apresentadas, no entanto, deve ser compreendido que as modalidades apresentadas são meramente exemplificadoras, as quais podem ser incorporadas de várias formas. Portanto, os detalhes funcionais específicos aqui apresentados não

devem ser interpretados como limitados, mas meramente como uma base para as reivindicações e como uma base representativa para ensinar um versado na técnica a empregar variavelmente a proteína recombinante aqui apresentada.

[0076] A presente invenção apresenta uma proteína recombinante homogênea para melhorar a apresentação do número máximo de epítopos do fator de crescimento, de epítopos do antígeno de tumor, e/ou de sítios de ligação do receptor como elementos de uma proteína recombinante imunogênica. Em uma modalidade ilustrativa, é descrita uma proteína recombinante que expressa toda ou partes da toxina B de cólera (CT-B), e um fator de crescimento epidérmico humano (EGF), um antígeno de tumor e/ou um receptor. Em modalidades ilustrativas alternativas, a proteína pode expressar outras proteínas recombinantes imunogênicas que são modeladas com base em proteínas imunogênicas conhecidas. É contemplado dentro do âmbito da invenção que tais proteínas recombinantes serão expressões dos polipeptídeos que são altamente imunogênicos ao sistema imunológico humano. De preferência, as proteínas recombinantes conferem propriedades adicionais à proteína quimérica, por exemplo, alto rendimento de expressão e facilidade de fabricação, estabilidade oral e capacidade de cruzar do intestino à corrente sanguínea, e/ou uso seguro precedente em seres humanos.

[0077] Em uma modalidade ilustrativa, as proteínas recombinantes aqui apresentadas podem incluir ou expressar uma proporção elevada de uma sequência de proteína derivada de autoantígenos alvo, como uma função do peso molecular total. Isto pode ser obtido, por exemplo, ao usar um modelo de proteína grande contendo múltiplos epítopos múltiplos de um fator de crescimento. Esses epítopos do fator de crescimento podem ser múltiplas cópias de todo ou parte de um único fator de crescimento, ou cópias de todo ou parte de mais de um fator

de crescimento diferentes.

[0078] De acordo com a invenção, as expressões dos epítopos do fator de crescimento devem ser desdobradas, permitindo que a sua conformação natural seja substancialmente retida e apresentada aos componentes do sistema imunológico do hospedeiro de maneira tal a acarretar uma resposta imunológica do hospedeiro robusta aos ditos epítopos. Os exemplos de modelos da proteína natural apropriados para modelar um domínio de suporte de epítopo de uma proteína recombinante incluem, mas sem ficar a eles limitados, a subunidade de toxina B de cólera, as subunidades de enterotoxina B LT e LT-II termicamente lábeis de *E. coli*, veratoxina, toxina pertussis, enterotoxina de *C. jejuni*, toxina Shiga, toxina de listeria, toxoide do tétano, toxoide de difteria, proteína da membrana externa de *N. meningitidis*, proteína de revestimento de bacteriófago, adenovírus e outras proteínas de revestimento viral. Alternativamente, um não autocomponente da proteína pode ser pequeno. Como um mínimo, a(s) não autosequência(s) deve(m) compreender cerca de 9, 10, 11 ou mais aminoácidos no comprimento, e inclui tanto completamente ou em parte pelo menos um epítopo de célula T humana. Alternativamente, podem ser usados polipeptídeos 'sintéticos' não naturais que preenchem os requisitos de conferir uma capacidade imunogênica à proteína integral e de permitir a apresentação apropriada do(s) fator(es) do crescimento, receptores, antígenos de tumor ou epítopos dos mesmos ao sistema imunológico do hospedeiro.

[0079] Em uma modalidade ilustrativa, o domínio de suporte de epítopo da proteína recombinante, se for derivado de uma sequência natural ou sintética de polipeptídeo, deve ter a capacidade de automontagem em multímeros oligoméricos sob condições químicas/ambientais apropriadas, ou ser reduzido em monômeros sob

condições alternativas. Idealmente, os domínios de multimerização irão ser montados em multímeros estáveis com um número distinto de subunidade, por exemplo, dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros, etc., de maneira tal que um produto de tamanho homogêneo é gerado. Os exemplos de polipeptídeos naturais incluem, mas sem ficar a eles limitados, zíperes de leucina, proteína repressora de lac, estreptavidinlavidina, subunidade de toxina B de cólera, subunidades de outras toxinas de AB_5, domínio de trimerização de *Pseudomonas*, e proteínas de capsídeos virais.

[0080] De acordo com a invenção, as proteínas recombinantes, que sejam fatores de crescimento ou partes dos mesmos, receptores celulares ou partes dos mesmos, antígenos de tumor ou partes dos mesmos, estão relacionadas à ampla gama de vias celulares envolvidas na doença crônica ou nos cânceres para fatores de crescimento e receptores e à gama mais ampla possível de tumores sólidos para o uso de antígenos de tumor dentro das ditas proteínas sintéticas. As proteínas estão na forma de uma proteína recombinante e podem ser úteis no tratamento de doenças crônicas, por exemplo, de cânceres da mama, do pulmão, da bexiga, do ovário, da vulva, do cólon, pulmonar, do cérebro, colorretal, intestinal, da cabeça e da garganta, e do esôfago. Uma vez que os antígenos de tumor diferentes podem ser expressos e múltiplos receptores celulares e fatores de crescimento superexpressos nas ditas doenças, as proteínas descritas a seguir podem conter um ou mais antígenos de tumor diferentes, um ou mais receptores ou fatores de crescimento diferentes de uma ou múltiplas vias celulares associadas com a doença. Essas proteínas são chamadas de "multivalentes".

[0081] Em uma modalidade ilustrativa, é apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa um ou mais domínios neutralizadores de fator de

crescimento epidérmico (EGF). A proteína está na forma de uma proteína recombinante e pode ser útil no tratamento de doenças crônicas, por exemplo, nos cânceres da mama, do pulmão, da bexiga, do ovário, da vulva, do cólon, pulmonar, do cérebro, colorretal, da cabeça e da garganta, e do esôfago. Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências de EGF e sequências de CT-B.

[0082] Em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa um fator de crescimento de fibroblasto (FGF). Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências de FGF e sequências de CT-B.

[0083] Em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa o fator de crescimento de transformação Beta 1 (TGF-β1). Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências de TGF-β1 e sequências de CT-B.

[0084] Ainda em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa um fator de crescimento de transformação Beta 1 (TGF-β1). Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências de TGF-β1 e sequências de CT-B.

[0085] Em uma modalidade ilustrativa, é apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa um fator-1 do crescimento do tipo insulina (IGF-1). Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências de IGF-1 e sequências de CT-B.

[0086] Em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentada uma

proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa um fator de crescimento de hepatócito (HGF). Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências de HGF e sequências de CT-B.

[0087] Em uma modalidade ilustrativa adicional, é apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa um fator-1 do crescimento do tipo insulina (IGF-l) e um fator-2 do crescimento do tipo insulina. Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências de IGF-1, sequências de IGF-2 e sequências de CT-B.

[0088] Ainda em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa um fator A do crescimento endotelial vascular (VEGF-A) e um fator C do crescimento endotelial vascular (VEGF-C). Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências de domínios neutralizadores de VEGF-A, sequências de VEGF-C e sequências de CT-B.

[0089] Para determinar a(s) região(ões) de codificação apropriada(s) de HuEGF a ser expressas ou incluídas, as sequências e as estruturas de moléculas de EGF de uma gama de organismos são analisadas. Uma tabela ilustra as sequências e as estruturas de moléculas de EGF de uma gama de organismos é descrita com referência à Fig. 1. Tal como ilustrado na Fig. 1, uma caixa 100 encerra uma parte da sequência das moléculas de EGF da gama de organismos, a qual representa o epítopo do domínio neutralizador das moléculas de EGF. Embora haja uma quantidade significativa de conservação entre os epítopos do domínio neutralizador das moléculas de EGF de espécies diferentes, também há um bocado de

variação entre as espécies. Marcadamente para os estudos *in vivo*, um domínio neutralizador (sequência na caixa 100) é totalmente conservado entre os primatas, mas é diferente nos roedores e em outras espécies. Similarmente, as sequências diferentes das moléculas de EGF se igualam às diferenças na estrutura terciária.

[0090] Uma estrutura da molécula de EGF humano, incluindo o domínio neutralizador de EGF, de acordo com uma modalidade ilustrativa é descrita com referência à Fig. 2. A molécula de EGF contém seis resíduos de cisteína incluindo Cys6, Cys14, Cys20, Cys31, Cys33 e Cys42. Os seis resíduos de cisteína são importantes na determinação do desdobramento da molécula de EGF. O domínio neutralizador de EGF 200 (ilustrado como uma β-folha antiparalela) é limitado por dois pares de cisteína ligados por bissulfeto separados, Cys6-Cys20 e Cys14-Cys31. Os dois pares de cisteína ligados por bissulfeto, Cys6-Cys20 e Cys14-Cys31, são importantes porque esses dois pares definem a sequência mínima ou peptídeo mínimo da molécula de EGF que apresenta o domínio neutralizador de EGF 200 na conformação correta.

[0091] Uma estrutura de linha simplificada dos pares de cisteína da molécula de EGF, incluindo EGF alça B 200, de acordo com uma modalidade ilustrativa, é descrita com referência à Fig. 3. Tal como ilustrado na Fig. 3, Cys6 é ligada a Cys20, Cys14 é ligada a Cys31, e Cys33 é ligada a Cys42. A alça B 200 de EGF fica localizado entre Cys20 e Cys31. Desse modo, a sequência mínima ou peptídeo mínimo 400 da molécula de EGF que apresenta o domínio neutralizador de EGF 200 na conformação correta é a sequência de Cys6 a Cys31, tal como ilustrado na Fig. 4.

[0092] Uma estrutura de uma molécula de proteína recombinante modificada de acordo com a invenção que expressa pelo menos uma parte da molécula de EGF, incluindo o domínio neutralizador de EGF

de acordo com uma modalidade ilustrativa é descrita com referência à Fig. 5. Uma única mutação ou mudança é feita em Cys33 da molécula de EGF para produzir a molécula sintética modificada que muda Cys33 em Ala33 para remover Cys33 para impedir quaisquer problemas de desdobramento incorreto possíveis.

[0093] A alanina é usada porque a alanina é razoavelmente 'neutra' em termos de características funcionais e tem a menor cadeia lateral além da glicina. A alanina, portanto, é considerada como o resíduo menos provável de conferir quaisquer características não nativas à proteína recombinante modificada. Dentro do âmbito da invenção é contemplado que potencialmente qualquer outro resíduo poderia ser usado, ou até mesmo não ser feita nenhuma mudança absolutamente.

[0094] Em uma modalidade ilustrativa, qualquer parte da molécula de EGF pode ser usada da região definida pelos resíduos Met21-Ala30 até toda a sequência de EGF. As sequências selecionadas para a expressão nas proteínas recombinantes de EGF-CT-B nos exemplos incluem toda a sequência de EGF, e separadamente uma região que se acredita ser requerida para a apresentação correta do domínio neutralizador definido como um domínio neutralizador no contexto usado, e não inclui nenhuma outra parte de EGF que não é considerada como necessária para obter isto.

[0095] Em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa um domínio neutralizador do fator a do crescimento endotelial vascular (VEGF-A). Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências de VEGF-A e sequências de CT-B. Em uma modalidade ilustrativa, a sequência de VEGF-A irá incluir o domínio neutralizador que compreende a sequência de Cys57 a Cys104 da proteína madura.

Em uma outra modalidade ilustrativa, a sequência de VEGF-A irá incluir um ou mais resíduos de flanqueio que se estendem até Val14 e Lys108.

[0096] Em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa o domínio de ligação do ligando do receptor de TGF-Beta II. Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências de TGFB-RII e sequências de CT-B. A sequência de TGFB-RII irá incluir qualquer sequência do domínio extracelular entre Thr23 e Gln166.

[0097] Em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea que expressa o domínio de ligação do ligando do receptor de HGF (c-Met). Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína recombinante que expressa ou inclui sequências do receptor de HGF e sequências de CT-B. De preferência, a sequência do receptor de HGF irá incluir qualquer sequência do domínio de SEMA extracelular entre Lys27 e Leu515.

Exemplo I: Protocolos de ELISA

[0098] A fim de determinar se as proteínas recombinantes, tais como as proteínas de EGF-CT-B sintéticas de acordo com a invenção, podem exibir a alça B de EGF na conformação correta, foram obtidos dois anticorpos monoclonais comerciais (Anticorpos Santa Cruz, Cat nº. 10825 e 10827) que são conhecidos como bloqueadores da ligação de EGF ao receptor de EGF. Sem ficar limitado a nenhuma teoria particular, é postulado a partir de um número de fontes que a ligação ao receptor de EGF é obtida em parte através da região definida pelos resíduos Met21-Ala30.

[0099] Em uma modalidade ilustrativa, concentrações de 1 μg/mL e 2 μg/mL de mAb 10825 e mAb 10827 foram usadas para ligar uma

proteína de EGF recombinante (rEGF) em ELISA, e a densidade ótica (OD) foi medida a 450 nm. Os resultados são ilustrados em um gráfico de barras com referência à Fig. 6. Tal como ilustrado na Fig. 6, a rEGF retém a sua conformação natural adsorvida em uma placa de ELISA e 1 μg/mL de mAb 10825 ou então de mAb 10827 é suficiente para obter um bom sinal.

[00100] Para avaliar o reconhecimento dos resíduos Met21-Ala30, uma placa foi revestida com cerca de 100 μL/cavidade de proteína (rEGF) a cerca de 1 μg/mL e incubada a 37°C por 1 hora. A placa foi lavada duas vezes com cerca de 200 μL/cavidade de PBS-0,5% de Tween (PBST), e então duas vezes com cerca de 200 μL de PBS. A placa foi bloqueada com cerca de 200 μL/cavidade de PBS-2% de leite em pó (MPBS) e incubada por cerca de 1 hora a cerca de 37°C. A placa foi lavada então duas vezes com PBST e duas vezes com PBS, tal como acima. Cerca de 100 μL dos anticorpos de teste foram adicionados a cerca de 1 μg/mL ou cerca de 2 μg/mL e incubados por cerca de 1 hora mais ou menos à temperatura ambiente (RT). A placa foi lavada outra vez tal como descrito acima. Em seguida, um anticorpo (Fc-específico anticamundongo marcado com HRP, código de produto Sigma A0168) foi adicionado a cerca de 1/1000 de diluição, a cerca de 100 μL/cavidade, e incubado por cerca de 1 h mais ou menos à RT. A placa foi lavada outra vez tal como acima, e revelada com cerca de 100 μL/cavidade de substrato de Sureblue TMB até a cor ser revelada (normalmente cerca de 5-10 minutos). A reação foi interrompida com cerca de 50 μL/cavidade de 1M H_2SO_4, e a placa foi lida a cerca de 450 nm.

[00101] Além disso, um ensaio ELISA de ligação competitiva foi realizado. No segundo ensaio ELISA a ligação de cada um dos anticorpos de mAb 10825 e mAb 10827 a rEGF foi avaliada na presença tanto de um peptídeo solúvel livre que corresponde ao

epítopo de interesse (sequência de peptídeo MYIEALDKYA) quanto de um peptídeo irrelevante de controle (sequência de peptídeo SLAGSSGALSK). Os ensaios ELISA com cerca de 100 μL/cavidade a cerca de 1 μg/mL de mAb 10825 mais cerca de 1 μg/mL do peptídeo solúvel livre que corresponde ao epítopo alvo, cerca de 1 μg/mL de mAb 10827 mais cerca de 1 μg/mL do peptídeo solúvel livre Met21-Ala30, cerca de 1 μg/mL de mAb 10825 mais cerca de 1 μg/mL do peptídeo irrelevante de controle, e cerca de 1 μg/mL de mAb 10827 mais cerca de 1μg/mL do peptídeo irrelevante de controle foram realizados.

[00102] A densidade ótica (OD) foi medida a 450 nm. Os resultados são ilustrados em um gráfico de barras com referência à Fig. 7. Tal como ilustrado na Fig. 7, dos dois anticorpos, mAb 10825 e mAb 10827, fica evidente de que o anticorpo de mAb 10827 se liga ao epítopo neutralizador de Met21-Ala30 e o anticorpo de mAb 10825 não o faz. O anticorpo de mAb 10825 é provavelmente neutralizador em virtude do impedimento estérico da ligação do receptor pelo bloqueio de uma região de EGF conformacionalmente proximal à região definida pelos resíduos Met21-Ala30. Desse modo, o anticorpo de mAb 10827 se liga ao epítopo neutralizador de eEGF Met21-Ala30 em seu estado nativo, e foi usado na análise a seguir dos precursores de vacina de EGF-CT-B sintéticos.

Exemplo II: Apresentação do Epítopo Neutralizador de EGF

[00103] Para determinar se a vacina de EGF-CT-B de proteína recombinante que expressa EGF em um terminal da sequência de CT-B interfere ou não ou então influencia qualquer uma das características inerentes desejadas do(s) domínio(s) de EGF, especificamente a apresentação conformacional correta do epítopo de EGF Met21- Ala30, e a capacidade dos monômeros de CT-C de ser montados como multímeros (anéis de pentâmeros) sob condições

físico-químicas apropriadas, seis proteínas recombinantes foram criadas expressando toda a região de codificação de EGF na sequência de CT-B tanto no N-terminal (Teste 1 - Teste 3) quanto no C-terminal (Teste 4 – Teste 6).

[00104] O Teste 1 e o Teste 4 incluem a vacina de EGF-CT-B da proteína recombinante que expressa a sequência de EGF de comprimento total diretamente no domínio de CT-B. O Teste 2 e o Teste 5 incluem a vacina de EGF-CT-B sintética que expressa a sequência de EGF de comprimento total separada do domínio de CT-B por uma sequência de peptídeo de e aminoácidos curta. A vacina de EGF-CT-B de proteína recombinante que expressa a sequência de EGF no N-terminal inclui SerGlyGly como a sequência de peptídeo de 3 aminoácidos, e inclui um sítio de restrição de KpnI. A vacina de EGF-CT-B da proteína recombinante que expressa a sequência de EGF no C-terminal inclui SerSerGly como a sequência de peptídeo de 3 aminoácidos, e inclui um sítio de restrição de XhoI.

[00105] O Teste 3 e o Teste 6 incluem a proteína recombinante EGF-CT-B que expressa a sequência de EGF de comprimento total separada do domínio de CT-B por uma sequência de peptídeo de 5 aminoácidos curta. A proteína recombinante EGF-CT-B que expressa a sequência de EGF no N-terminal inclui GlyGlySerGlyGly como a sequência de peptídeo de 5 aminoácidos, e inclui um sítio de restrição de KpnI. A EGF-CT-B sintética que expressa a sequência de EGF no C-terminal inclui SerSerGlyGlyGly como a sequência de peptídeo de 5 aminoácidos, e inclui um sítio de restrição de XhoI. As sequências de peptídeos de 3 e 5 aminoácidos curtas servem para distanciar o domínio do fator de crescimento da sequência de CT-B, e também para um grau de liberdade de movimento de um domínio em relação ao outro, reduzindo desse modo qualquer impedimento estérico potencial.

[00106] Cada uma das seis proteínas recombinantes EGF-CT-B foi clonada em um vetor de expressão bacteriano (pIMS 147), de maneira tal que as proteínas EGF-CT-B recombinantes sintéticas podiam ser expressas no periplasma de *E. coli*, e purificadas pela inclusão de uma etiqueta 6xHis no C-terminal. Cada sequência de EGF-CT-B recombinante foi expressa, purificada e quantificada por meio de gel de proteína/ensaio de Bradford.

[00107] A apresentação do epítopo neutralizador de EGF Met21-Ala30 em cada uma das seis proteínas de EGF-CT-B recombinantes foi determinada por ELISA. As proteínas EGF-CT-B recombinantes, incluindo um domínio de EGF terminal, foram imobilizadas em uma placa de ELISA. Os epítopos de EGF Met21-Ala30 foram detectados com o anticorpo de mAb 10827 (Santa Cruz).

[00108] A placa de ELISA foi revestida com diluições de 2 vezes em série de proteínas purificadas com 6-His de EGF-CT-B sintéticas e incubada a cerca de 37°C por cerca de 1 hora. A placa foi lavada e bloqueada com cerca de 2% de MPBS, tal como descrito acima. A lavagem envolveu a pipetagem de cerca de 200 μl de PBS ou PBST em cada cavidade, a inversão da placa e uma sacudida para esvaziar as cavidades, e foi repetida. O anticorpo de mAb 10827 foi então adicionado a todas as cavidades a cerca de 1 μg/mL e incubado mais ou menos à temperatura ambiente por cerca de 1 hora. A placa foi lavada uma vez mais e uma peroxidase de raiz forte anticamundongo (HRP) foi adicionada às cavidades e incubada por cerca de mais uma hora. A placa foi lavada outra vez e revelada ao usar SureBlue TMB.

[00109] Com a adição do substrato de SureBlue TMB, a HRP conjugada ao anticorpo secundário processa enzimaticamente o substrato para formar um produto azul. A reação foi observada e monitorada até que foi decidido que a intensidade da cor alcançou um nível suficiente. (Se a cor começar a aparecer nas cavidades de

controle, que não contêm nenhum anticorpo primário, então a reação é interrompida nesse momento). A reação é interrompida pela adição de cerca de 50 μL de H_2SO_4 que destrói a atividade de HRP. Ela também muda a cor do produto da reação de azul para amarelo. Isto pode então ser medido em um leitor de placas a uma absorbância de cerca de 450 nm.

[00110] Os resultados dos ensaios ELISA de ligação são ilustrados em um gráfico de linha com referência à Fig. 8. Tal como ilustrado na Fig. 8, o anticorpo de mAb 10827 podia se ligar a todas as seis proteínas recombinantes de EGF-CT-B purificadas com 6-His, demonstrando que em cada formulação o epítopo de EGF-Met21-Ala30 é apresentado em sua conformação nativa e é acessível aos componentes do sistema imunológico.

[00111] A fim de confirmar que a proteína de EGF-CT-B recombinante sintética incluía expressões do domínio de EGF e a sequência de CT-B, um segundo ensaio ELISA foi realizado, por meio do qual, ao invés de adsorver a proteína recombinante diretamente nas placas, a proteína recombinante foi por sua vez capturada ao usar um anticorpo anti-CT-B de coelho (Antibodies On-Line), tal como mostrado na Fig. 9. Uma vez que este anticorpo 'de captura' é específico para CT-B nativo, o ensaio demonstra que os domínios neutralizadores de EGF detectados são componentes de uma proteína recombinante maior que inclui um domínio de CT-B corretamente desdobrado.

Exemplo III: Montagem de Multímero de Proteína de EGF-CT-B

[00112] A fim de examinar o efeito da expressão de um domínio estrutural que compreende um fator de crescimento nos terminais da proteína recombinante derivada de CT-B na montagem de multímeros a partir de subunidades monoméricas, o Teste 1 - Teste 6 de proteínas sintéticas foram realizados em um gel de SDS-PAGE sob condições

nativas (não reduzido, não fervido). As proteínas de EGF-CT-B recombinantes sintéticas foram transferidos então para uma membrana de nitrocelulose por meio de eletrotransferência, e foram marcadas ao usar um anticorpo anti-CT-B de coelho (tal como descrito acima no Exemplo II). A ligação de um anticorpo secundário anticoelho marcado com HRP foi detectada através da luz emitida ao usar um substrato ECL na película de autoradiografia. Tal como ilustrado na Fig. 10, o Western Blot confirma a presença de CT-B de peso molecular elevado, indicando que as proteínas de monômero de EGF-CT-B sintéticas podem ser montadas como multímeros através do domínio de CT-B.

[00113] Em uma experiência separada, amostras duplicadas da proteína de CT-B nativa (não fervida ou reduzida) foram incubadas por 5 minutos em uma faixa de valores de pH diferentes do pH 1,0 ao 7,0. Depois da incubação, uma de cada amostra duplicada foi neutralizada de volta ao pH 7,0 por uma hora. Todas as amostras foram passadas então em um gel de SDS-PAGE, submetidas ao Western Blot, e a proteína detectada com anticorpo anti-CTB (Fig. 16). Isto demonstra que i) os pentâmeros de CTB podem ser reduzidos em monômeros a um pH 3,0 ou menos em 5 min, e que ii) o retorno ao pH neutro restaura a formação dos pentâmeros. Foi demonstrado previamente que uma proteína quimérica que compreende uma proteína de CT-B fundida a um sítio de ligação de anticorpo de camelídeo e etiquetas através de um ligante apropriado (peso molecular de ~16 kDa) pode ser feita para formar pentâmeros funcionalmente ativos (Li *et al.*, 2009 Molecular Immunology 46; 1718-1726).

Exemplo IV: Proteínas de EGF-CT-B Sintéticas Bivalentes

[00114] Em uma modalidade ilustrativa, duas proteínas de EGF-CT-B recombinantes sintéticas adicionais foram criadas, nas quais i) um gene de EGF de comprimento total é expresso AM ambos os terminais

N e C, separados do gene de CT-B pela sequência de três aminoácidos tal como descrito para o Teste 2 e o Teste 5 acima, e designado como 'E2', ou ii) um EGF truncado que inclui o epítopo neutralizador de Met21-Ala30 é expressa em ambos os terminais do gene de CT-B tal como acima, e designado como 'B2'. Ambas as proteínas recombinantes foram clonadas no vetor de expressão de *E. coli* pIMS147 tal como descrito acima. Ambas as proteínas de EGF-CT-B recombinantes foram expressas e purificadas tal como descrito previamente, e analisadas quanto à presença do domínio de CT-B corretamente desdobrado e à apresentação do epítopo neutralizador de EGF Met21-Ala30 na conformação correta. Os resultados são ilustrados em um gráfico de linhas com referência à Fig. 11. Tal como ilustrado na Fig. 11, ambas as proteínas de EGF-CT-B recombinantes E2 e B2 compreendem um domínio de CT-B e pelo menos um epítopo de EGF Met21-Ala30 funcionalmente correto exibido de modo a ser acessível a um anticorpo.

[00115] Uma análise adicional envolveu a colocação de amostras de proteínas de EGF-CT-B recombinantes E2 e B2 purificadas em géis de SDS-PAGE não desnaturantes a um pH 7,0 sem ferver primeiramente as amostras, e a transferência para membranas de nitrocelulose através de eletrotransferência. As proteínas transferidas foram detectadas ao usar o anticorpo policlonal de coelho anti-CT-B da AbOL (Antibodies On-Line) e um anticorpo anticoelho marcado com HRP. Tal como ilustrado na Fig. 12, o Western Blot indica que as proteínas recombinantes contendo domínio de CT-B existem ambas como monômeros, e também foram formadas em uma série de multímeros oligoméricos que compreendem dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros.

Exemplo V: Sequência de Proteína de EGF-CT-B

[00116] Um exemplo de uma sequência de uma proteína de EGF-

CT-B recombinante sintética é ilustrada na Fig. 13. Tal como ilustrado na Fig. 13, a sequência de amostra ilustra a sequência de proteína sintética que inclui duas sequências de EGF de comprimento total, as quais são sublinhadas, e uma sequência de CT-B, a qual está em itálico.

Exemplo VI: Sequência de Proteína de EGF-CT-B

[00117] Um outro exemplo de uma sequência de uma proteína de EGF-CT-B recombinante sintética é ilustrado na Fig. 14. Tal como ilustrado na Fig. 14, a sequência de amostra ilustra a sequência de proteína que inclui duas sequências de domínios neutralizadores de EGF, as quais são sublinhadas, e uma sequência de CT-B, a qual está em é itálico.

Exemplo VII: Sequência de Proteína de EGF-CT-B

[00118] Um outro exemplo ainda de uma sequência de proteína de EGF-CT-B recombinante é ilustrado na Fig. 15. Tal como ilustrado na Fig. 15, a sequência da amostra ilustra a sequência de proteína que inclui as sequências parciais da molécula de EGF incluindo o domínio neutralizador de EGF (Cys6 a Cys31), as quais são sublinhadas, e uma sequência de CT-B, a qual está em itálico.

Exemplo VIII: Sequências de Proteínas de EGF-CT-B Incluindo Ligantes

[00119] Em outras modalidades, proteínas de EGF-CT-B recombinantes adicionais incluindo um ou mais ligantes ou espaçadores ilustrativos são aqui apresentadas. Uma ou mais das modalidades descritas acima incluem EGF fundido a CT-B em um ou ambos os terminais de CT-B de maneira tal que um gene segue diretamente para o seguinte. Essas proteínas recombinantes ou quiméricas resultantes incluíam essencialmente EGF fundido diretamente a CT-B. Em outras modalidades ilustrativas, os componentes de EGF e de CT-B da proteína quimérica são separados

eficazmente por 3 ou 5 aminoácidos, o que forma um espaçador ou um ligante flexível entre os dois domínios. Os aminoácidos seguintes que podem ser usados como ligantes incluídos, mas não limitados aos seguintes: SSG, SSGGG, SGG, GGSGG e GGGGS.

[00120] A adição dos ligantes pode reduzir interferências, por exemplo, do impedimento estérico, e ajuda na formação dos pentâmeros pelo domínio de CT-B. Os ligantes também permitiram que sítios de restrição singulares fossem introduzidos dentro dos ligantes para permitir a manipulação subsequente das construções genéticos. Neste exemplo, oito construções (Ti-T6, E2 e B2) são descritas, as quais têm as sequências listadas na tabela ilustrada na Fig. 17. Em uma modalidade ilustrativa os sítios de restrição incluem, mas sem ficar a eles limitados, os seguintes: Xho1, Kpn1, BspE1 e Spe1.

[00121] A análise de Western Blot das construções T1-T6, E2 e B2 foi feita e é descrita a seguir em conexão com a Fig. 18. Tal como ilustrado na Fig. 18, o Western Blot das construções E2 e B2 parece ser alguma interferência, por exemplo, o impedimento estérico e/ou uma outra interferência, que faz com que as proteínas produzidas compreendessem uma variedade de oligômeros, por exemplo, monômero, dímero, trímero, etc. Alternativamente, a concentração da proteína presente nas amostras pode ter influências da oligomerização, uma vez que é um fator dependente para a pentamerização de CTB nativa.

[00122] As faixas mais inferiores correspondem aos monômeros, os seguintes até os dímeros, etc. Uma vez que B2 inclui EGFs truncadas, parece ser menor do que E2, o que é ilustrado por B2 mais inferior no Western Blot.

[00123] Um resultado similar é encontrado para as construções T1-T6, embora os números e as proporções dos oligômeros variem de

construção para construção. Inicialmente, pareceu que as proteínas com EGF no N-terminal incluindo os ligantes de aminoácidos podiam propiciar uma proporção mais elevada de pentâmero. No entanto, subsequentemente foi verificado que a proporção de pentâmero variou de batelada a batelada.

[00124] Uma vez que foi postulado inicialmente que a fusão em um ou outro terminal favorece a pentamerização, duas fusões em tandem além da construção E2 foram construídas e são ilustradas na Fig. 19. A primeira fusão em tandem, designada como E2N, inclui dois EGFs consecutivos no N-terminal de CT-B, em que L-3 é SGG, e L-4 é GSSG. A segunda fusão, designada como E2C, inclui dois EGFs consecutivos no C-terminal de CT-B, em que L-3 é SSG, e L-5 é GGSGG.

[00125] Em uma modalidade ilustrativa, os comprimentos de ligantes de aminoácidos no N-terminal e no C-terminal foram estendidos para determinar se o comprimento do ligante de aminoácido em cada extremidade resulta ou não só no pentâmero, ou talvez que uma extremidade, o N-terminal ou o C-terminal, resulta em uma proporção mais elevada do pentâmero. Com referência à Fig. 20, os ligantes de aminoácidos do N-terminal e do C-terminal foram estendidos ao usar as construções T2/3 e T4/5, respectivamente. A ilustração (Fig. 20) refere-se à fusão do C-terminal E2C. Nesse exemplo ilustrativo, L3 é SSG, L5 é SSGGG, L8 é SSGGGSGG e L10 é SSGGGGSGGG. Na versão do N-terminal, os espaçadores de ligantes inseridos tinham cerca de 7 e 9 resíduos no comprimento. Nesse exemplo os 4 ligantes devem ser: L3 SGG, L5 GGSGG, L7 TSG GGSG e L9 TSGGGGSGG. Cada um dos ligantes-espaçadores pode ser inserido em cada um dos ligantes L3 e L5 mais curtos. Como resultado, a inserção de L7 em L5 ou de L9 em L3 resultam ambas em ligantes de 12 resíduos, no entanto eles devem ter sequências

diferentes, denominadas 'a' e 'b' a seguir. Os ligantes do N-terminal também foram estendidos para 10, 12 e 14 aminoácidos, e aqueles do C-terminal foram estendidos para 11, 13 e 15 aminoácidos, tal como ilustrado na Fig. 20. Nesse exemplo ilustrativo L10 é SSGGGSGGSSG, L2a é GGSGGTSGGGSG, L12b é SGGTSGGGGSGG, e L14 é GGSGGTSGGGGSGG. Similarmente, L11 é SSGGGSGGSSG, L13a é SSGGGGSGGGSSG, L13b é SSGGGSGGSSGGG, e L15 é SSGGGGSGGGSSGGG.

[00126] Com referência à Fig. 21, a análise de Western Blot das fusões de EGF em tandem, E2N e E2C, em comparação a construção bivalente original com E2 original demonstra que E2 e E2C produzem muitos oligômeros. E2N também produz oligômeros, no entanto, há uma indicação forte que o primeiro domínio de EGF está sendo expresso como uma proteína truncada, ou está sendo clivado em algum estágio durante a expressão/purificação.

[00127] Uma análise de Western Blot comparativa também foi feita nas construções 'T' monovalentes com os ligantes estendidos, e é ilustrada na Fig. 22. Quando as extensões de ligantes acima foram introduzidas nas construções já nomeadas como T2 e T3 (N-terminal, ligantes 3 e 5 aa, respectivamente), é obtido T2SL (ligante estendido curto, isto é, L10), T2LL (ligante longo, L12a) T3SL (ligante curto L12b), e T3LL (ligante longo L14). Similarmente, as construções do N-terminal T5 e T6 transformam-se em T5SL (com LI1), T5LL (com L12a), T6SL (com L13b) e T6LL (com L15).

[00128] Quando os espaçadores de ligante são inseridos, eles podem realmente ser clonados em qualquer uma de duas direções, propiciando sequências bastante diferentes. Onde quer que seja possível, clones suficientes foram arranjados em sequência para encontrar um com a inserção na direção desejada. No caso de T3LL-Rev, inicialmente se tinha somente um clone com o comprimento de

ligante desejado (isto é, 14 aa), mas com a inserção na orientação 'errada'. Serve para ilustrar como as sequências menos precisas desses ligantes não são necessariamente críticas, pelo menos até agir como um espaçador físico. A sequência de ligante real de T3LL-Rev deve ser GGSGGTRPSTAATS (sublinhado = seção invertida).

[00129] Tal como ilustrado no Western Blot ilustrada na Fig. 22, N e R referem-se a proteína nativa e reduzida/desnaturada, respectivamente. As primeiras duas raias ilustram CT-B do tipo selvagem como um pentâmero (nativo) e um monômero (reduzido). Tal como ilustrado nas outras raias, pode ser visto que T3 (incluindo o ligante de 5 aminoácidos) produziu alguns oligômeros de vários tamanhos, no entanto, todas as construções do N- ou C-terminal com ligantes mais longos produz principalmente o pentâmero quando empregado sob condições nativas.

[00130] Por outro lado, tal como ilustrado na Fig. 23, o Western Blot das construções do C-terminal produziu múltiplas faixas sob condições nativas até mesmo com ligantes estendidos.

[00131] Com base nesses dados, a fusão de N-terminal em tandem a CT-B parece ser de interesse significativo. Além disso, o primeiro ligante (entre os dois domínios de EGF) pode ser estendido para tentar impedir a truncação/proteólise descrita acima com a construção de E2N, e permitir a flexibilidade quando são introduzidos fatores de crescimento alternativos. A sequência para a fusão de N-terminal de EGF a CT-B com o primeiro ligante estendido é tal como segue:

[00132] H H H H H H I E G R N S D S E C P L S H D G Y C L H D G V C M Y I E A L D K Y A C N C V V G Y I G E R C Q Y R D L K W W E L R G G S G G T S G G G G S G G T P Q N I T D L C A E Y H N T Q I H T L N D K S E S Y T E S L A G K R E M A I I T F K N G A T F Q V E V P G S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I A Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A I A A I S M A N

[00133] Embora as proteínas recombinante homogêneas que expressam ou incorporam epítopos de EGF alça B tenham sido descritas e ilustradas em conexão com determinadas modalidades, muitas variações e modificações serão evidentes para aqueles versados na técnica e podem ser feitas sem que se desvie do caráter e âmbito da invenção.

Exemplo IX: Proteína de IGF1-EGF-CTB biespecífica (a).

[00134] A fim de estabelecer a praticabilidade de visar mais de um fator de crescimento com uma única proteína recombinante sintética, um gene que codifica o fator de crescimento do tipo insulina I humano (IGF1) foi sintetizado, incluindo regiões de flanqueio curtas para permitir a clonagem na construção E2N descrito no Exemplo VIII. Em resumo, o gene de EGF do N-terminal foi excisado do vetor ao digerir o DNA com as endonucleases de restrição Nco1 e Xho1. Foi então substituído pelo gene IGF1 humano diferido de maneira similar ao usar métodos familiares dos elementos versados na técnica. O vetor de DNA resultante foi arranjado em sequência para confirmar que codificou o gene recombinante requerido de uma maneira tal a permitir que a proteína recombinante seja expressa tal como desenhada. A sequência da nova proteína recombinante é ilustrada na Fig. 24.

[00135] Subsequentemente, a proteína gerada pela expressão do vetor acima mencionado foi analisada por meio de ELISA para demonstrar que ambos os fatores de crescimento podem ser simultaneamente exibidos aos componentes (isto é, anticorpos) do sistema imunológico de mamíferos. Em resumo, as cavidades de uma placa de ELISA foram revestidas com uma diluição apropriada de anticorpo anti-CTB e então bloqueadas com PBS contendo 2% de leite em pó tal como descrito previamente. As amostras da proteína recombinante foram aplicadas à placa e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após a lavagem, cavidades diferentes

preparadas tal como descrito foram incubadas então com 1/1000 (ou de acordo com as recomendações do fornecedor) de i) anticorpo anti-EGF de camundongo AbOL 10827 ou ii) anticorpo anti-humano de coelho IGFI 2o. Após a lavagem, as cavidades foram incubadas com uma diluição apropriada i) anticorpo anticamundongo marcado com HRP ou ii) anticorpo anticoelho marcado com HRP, e foram então revelados tal como descrito previamente. Tal como ilustrado na Fig. 25, os sinais gerados confirmaram que IGF e EGF são exibidos em suas configurações nativas. O sinal gerado pelo anticorpo anti-IGF também confirma que as sequências de IGF, de EGF e CTB estão presentes na mesma molécula devido às posições relativas das sequências de DNA de codificação no vetor de expressão.

Exemplo X: Proteína de IGFI-EGF-CTB biespecífica (b).

[00136] A fim de demonstrar que as proteínas recombinantes biespecíficas podem ser geradas ao usar a característica natural de CTB para formar oligômeros, o gene de IGF descrito no Exemplo IX foi modificado por meio de PCR ao usar técnicas familiares aos elementos versados na técnica para permitir que seja clonado na construção T5, substituindo o gene EGF. A proteína recombinante resultante incluía as sequências de IGF do C-terminal às sequências de CTB, e separadas por um ligante de 3 aminoácidos (Fig. 26).

[00137] As amostras da proteína recombinante acima foram combinadas separadamente com quantidades iguais (molares) de i) proteína T2 e ii) proteína T5. Cada uma das misturas foi ajustada a um pH 3,0 pela adição de 10 mM de Tris-HCl tamponado tal como necessário e incubada a 4°C por 15 min para dissociar todos os oligômeros presentes. As misturas de proteínas foram neutralizadas então, e a incubação foi continuada por 60 minutos a fim de incentivar a oligomerização. Para detectar a presença de hetero-oligômeros, as cavidades de uma placa de ELISA foram revestidas com anticorpo

anti-EGF de camundongo ou então com anticorpo anti-IGF de coelho, e bloqueadas. Após a lavagem, a mistura de IGF-CTB/T2 e a mistura de IGF-CTB/T5 foram aplicadas separadamente às cavidades revestidas com o anticorpo anti-EGF ou com o anticorpo anti-IGF, e incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente.

[00138] Após a lavagem, o anticorpo específico para o fator de crescimento não visado pelo anticorpo de revestimento foi adicionado e incubado por 60 min. Desse modo, o anticorpo anti-IGF de coelho foi aplicado a cavidades revestidas com o anticorpo anti-EGF de camundongo, e vice-versa. Após a lavagem para remover o anticorpo 2o não ligado, o anticorpo anticoelho marcado com HRP ou anticamundongo marcado com HRP foi aplicado tal como apropriado para visar o anticorpo 20. Os resultados são ilustrados na Fig. 27, e demonstram que o anticorpo de revestimento anti-EGF pode capturar e imobilizar a proteína que contém sequências de IGF. Similarmente, o anticorpo anti-IGF pode capturar e imobilizar a proteína que inclui sequências de EGF. Em ambos os casos, isto é causado pela oligomerização de monômeros contendo IGF e EGF de maneira tal que ambos estão presentes. Além disso, os hetero-oligômeros podem se formar quando ambos os fatores de crescimento estão localizados em terminais opostos do componente de CTB (isto é, IGF-CTB e T2) e quando ambos os fatores de crescimento estão no mesmo terminal (C) (isto é, IGF-CTB e T5). O ensaio também funciona em uma ou outra orientação.

Exemplo XI: Apresentação de fator de crescimento diverso.

[00139] A fim de demonstrar ainda mais a flexibilidade da presente invenção, um painel de proteínas recombinante foi gerado, o qual incluiu a sequência derivada de CTB junto com a sequência adicional derivada de um ou mais de uma gama de fatores de crescimento e que representam uma faixa de domínios de tamanho variado de

acordo com a Figura 28 ao usar técnicas padrão familiares àquelas praticadas no estado da técnica. As amostras de cada uma das proteínas foram preparadas pela expressão da construção genética em *E. coli* e purificadas ao usar IMAC através da marcação de hexa-histidina no N-terminal para cada proteína. As proteínas recombinantes purificadas foram submetidas à análise ELISA para demonstrar que cada uma das sequências diferentes estava presente e exibida corretamente ao usar anticorpos específicos para cada sequência (Figura 29). Uma proteína nativa foi empregada com as amostras da proteína recombinante incluindo as sequências derivadas de mTGF B1 e CTB e um Western Blot preparado (Figura 30). A proteína foi detectada com anticorpo de α-CTB e mostrou que, sob as condições usadas, a proteína quimérica recombinante podia formar pentâmeros estáveis, mantendo essa característica de CTB.

Exemplo XII: Apresentação do receptor do fator de crescimento

[00140] A fim de demonstrar a fim que a tecnologia descrita na presente invenção é aplicável à exibição funcional de proteínas que não os fatores de crescimento, proteínas recombinantes incluindo as sequências derivadas dos receptores do fator de crescimento e CTB foram geradas, e foi mostrado que elas apresentam tais sequências em uma conformação natural em conjunto com as sequências de CTB. O DNA que codifica a sequência da proteína de TGF-beta1 humano foi clonado a montante do gene de CTB mediante a substituição do DNA de codificação de EGF do clone de T3LL ao usar as técnicas padrão familiares àquelas praticadas no estado da técnica. Essa construção foi usada para gerar uma proteína recombinante que incluía ambas as sequências de TGF-beta1 e CTB humanas (Figura 31a). Do mesmo modo, uma segunda proteína recombinante foi gerada, a qual incluía sequências do domínio de ligação de ligando extracelular do receptor de TGF Beta e CTB humano (Figura 31b).

[00141] A apresentação simultânea de ambas as sequências de TGF-Beta R2 e CTB em uma única proteína recombinante foi estabelecida por ELISA de captura. Em resumo, as cavidades de uma placa de ELISA foram revestidas com i) anticorpo anti-CTB de camundongo ou ii) anticorpo anti TGF Beta R2 de cabra e bloqueadas com PBS contendo leite em pó. As amostras da proteína recombinante, de acordo com a Figura 31b foram então foram colocadas em contato com as cavidades e incubadas por cerca de 1 hora. Depois da lavagem, as cavidades foram colocadas em contato com i) anticorpo anti-TGF Beta R2 de cabra ou ii) anticorpo anti-CTB de camundongo, respectivamente, e incubadas por 1 hora. Depois da lavagem, as cavidades foram colocadas em contato com i) anticorpo anticarneiro (cabra) marcado com HRP e ii) anticorpo anticamundongo marcado com hRP, respectivamente, e por cerca de 1 hora. A placa foi revelada com substrato de TMB e a intensidade da cor foi medida a 450 nm. O ensaio demonstrou que ambas as sequências de TGF-beta R2 e CTB estavam presentes na mesma proteína recombinante quimérica (Figura 32).

[00142] A fim de demonstrar que TGF-Beta1 e TGF Beta R2 foram ambos apresentados separadamente com sequências de CTB em uma configuração nativa, a interação entre TGF beta1 e seu receptor natural foi determinada por meio de ELISA. Em resumo, as cavidades de uma placa de ELISA foram revestidas com anticorpo anti-CTB de camundongo e bloqueadas. As cavidades foram colocadas em contato então com a proteína recombinante que contém sequências de TGF-Beta 1 e CTB tal como descrito na Figura 31a e incubadas por cerca de 1 hora. Após a lavagem, as cavidades foram colocadas em contato com a proteína recombinante que contém sequências de TGF-beta R2 e CTB humanas tal como descrito na Figura 31b e incubadas por cerca de 1 hora. As cavidades foram lavadas e colocadas em contato

então com o anticorpo anti-TGF Beta R2 de cabra por 1 hora. Finalmente, as cavidades foram lavadas e colocadas em contato com anticorpo anticarneiro (cabra) marcado com HRP por cerca de 1 hora. A placa foi revelada com substrato de TMB e lida a 450 nm. A Figura 33 ilustra que as duas proteínas recombinantes podem reproduzir a interação de ligação de receptor-ligando natural, e que isto não é perturbado pelo anticorpo antirreceptor usado no ensaio.

Exemplo XIII: Respostas imunológicas dos camundongos às formulações de proteínas recombinantes

[00143] Em uma outra experiência grupos de camundongos foram imunizados com proteínas recombinantes incluindo sequências de CTB e um ou mais fatores de crescimento de acordo com a presente invenção a fim de avaliar os efeitos de várias formulações em respostas imunológicas dos ditos camundongos. Seis grupos de camundongos, cada um deles compreendendo seis camundongos, foram imunizados com uma formulação de proteína recombinante diferente de acordo com a programação descrita a seguir.

[00144] A menos que esteja indicado de alguma outra maneira, os camundongos foram imunizados com 25 μg de proteína recombinante em 75 μL de tampão, e emulsificados em 75 μL de adjuvante de montanide. Imunógenos foram administrados através de injeção i.m. no dia 0 e no dia 14. As amostras de soro foram tomadas no dia 0 (pré-imunização) e no dia 28 e analisadas quanto à presença de anticorpos de IgG versus as sequências do fator de crescimento contidas dentro da proteína recombinante de imunização. Os grupos de camundongos foram imunizados com os seguintes antígenos:

[00145] Grupo 1: SB1, 75 μL (25 μg) de proteína recombinante incluindo sequências de IGF e CTB humanas de acordo com a Figura 26 emulsionadas com 75 μL de montanide;

[00146] Grupo 2: SB2, 75 μL (25 μg) de proteína recombinante

incluindo sequências de EGF e CTB humanas tal como descrito no Exemplo VIII e indicadas como T3LL, e emulsionados com 75 μl de montanide;

[00147] Grupo 3: SB3, 75 μl (25 μg) de proteína recombinante incluindo sequências de IGF humano, sequências de EGF e CTB humanas de acordo com a Figura 24 e tal como descrito no Exemplo IX, e emulsionados com 75 μL de montanide;

[00148] Grupo 4: SB4, 37,5 μL (12,5 μg) de SB1 e 37,5 μL (12,5 μg) de SB2 combinados pelo método tal como descrito no Exemplo X e incluindo oligômeros que contêm ambos IGF-CTB e EGF-CTB, e emulsionados com 75 μL de montanide;

[00149] Grupo 5: SB5, 75 μL (25 μg) de SB1, tal como para o Grupo 1, exceto pelo fato que foram emulsionados com 20 μL de adjuvante Matrix-M; e

[00150] Grupo 6: SB6, 37,5 μL (12,5 μg) de SB1 emulsionado com 37,5 μL de montanide, seguidos depois de 5 minutos por 37,5 μL (12,5 μg) de SB2 emulsionados com 37,5 μL de montanide e administrados através de um local diferente.

[00151] Imediatamente antes da imunização e 14 dias após a mesma, as amostras de sangue foram tomadas e o soro foi analisado por meio de ELISA quanto à presença e títulos relativos de anticorpos de IgG versus o componente do fator de crescimento dos antígenos de imunização de proteína recombinante. As placas de ELISA foram revestidas com IGF ou EGF humano recombinante comercialmente disponível a uma concentração de 1 μg/mL. Após o bloqueio e a lavagem, o soro dos camundongos a várias diluições foi aplicado às cavidades e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo não ligado e outras proteínas foram removidos por meio de lavagem, e o IgG de camundongo ligado detectado com anticorpo anticamundongo marcado com HRP.

[00152] Todos os seis grupos incluíram animais que deram uma resposta imunológica específica ao componente do fator de crescimento das proteínas quiméricas recombinantes imunogênicas. É evidente que as respostas mais fortes são vistas mais para EGF do que para IGF no todo, incluindo os grupos em que as sequências de somente um fator de crescimento foram incluídas (Grupos 1 e 2, Figuras 34 e 35). Sem ficar limitado a nenhuma teoria particular, este é provavelmente um reflexo dos graus de homologia entre as proteínas de camundongo e humanas, por meio do que os EGFs diferem em 15/53 dos resíduos e os IGFs só diferem em 4 de 70 resíduos. Também pode ser observado que as diferenças entre as respostas de animais individuais dentro de um grupo são frequentemente maiores do que diferenças entre grupos ao mesmo antígeno.

[00153] O uso da Matrix-M ao invés de Montanide como adjuvante (Grupo 5 comparado ao Grupo 1, Figuras 40 e 34) resultou em uma resposta mais pobre, com um dos camundongos não respondendo de modo algum, e outras quatro amostras que precisam ser selecionadas concentrações muito maiores do que com Montanide.

[00154] Os Grupos 3, 4 e 6 receberam proteínas que incluíam sequências de EGF e IGF, e a diferença é a formulação ou a administração. Todos os camundongos do Grupo 3, que receberam a proteína recombinante que incluía sequências de EGF e de IGF em cada molécula de proteína, responderam a EGF embora dois dos seis não apresentaram uma resposta de α-IGF (Figuras 36 e 37). Todos os camundongos dos Grupos 4 e 6 também geraram anticorpos a EGF (Figuras 38, 39 e 41). No Grupo 4 um animal não respondeu a IGF e outro apresentou somente uma resposta muito fraca. Somente no Grupo 6, onde as proteínas contendo EGF e IGF foram administradas separadamente e em locais diferentes, todos os 6 animais apresentaram uma resposta a IGF.

Exemplo XIV: Purificação de uma etapa genérica

[00155] É desejável um processo de purificação simples de primeiro estágio que possa ser aplicado a qualquer uma e a todas as proteínas recombinantes imunogênicas detalhadas na presente invenção. Idealmente, a purificação não irá requerer a inclusão de uma etiqueta de afinidade tal como hexa-histidina, MBP, FLAG, etc. As proteínas recombinantes da presente invenção estão relacionadas, uma vez que todas elas incluem pelo menos alguma sequência derivada da subunidade de toxina de CT-B de *Vibrio cholera*, ou um equivalente funcional sintético. É previsto que a purificação pode ser obtida pelo uso de anticorpos monoclonais ou policlonais, no entanto anticorpos monoclonais são caros de produzir. Os anticorpos policlonais são menos caros, no entanto, é provável que variações no desempenho serão vistas entre bateladas do mesmo animal, e entre animais individuais. A purificação de imunoafinidade também requer condições inóspitas tais como um pH baixo para eluir a proteína alvo, o que pode afetar adversamente a proteína alvo, e irá limitar a reutilização da matriz de afinidade. Ela também envolve a introdução de proteína adicional no processo de produção, o que é de preferência evitado.

[00156] Na holotoxina de CT nativa, a toxina se liga ao monogangliosídeo Gm1 (Figura 42) encontrado na superfície da maior parte das células de mamíferos, incluindo células epiteliais do trato respiratório e do intestino. A ligação é efetuada pela subunidade de CT-B, e somente os oligômeros de CT-B se ligam a Gm1. Portanto, é previsto que o CTB imobilizado em um suporte apropriado pode ser usado para a purificação das proteínas recombinantes imunogênicas da presente invenção. O uso de CTB não é considerado como um método preferido, no entanto, por várias razões, marcadamente esse CTB só é disponível comercialmente como material purificado do cérebro de bovinos. O uso de material animal e o uso do tecido do

cérebro de bovinos não são particularmente apropriados para o uso na produção de produtos terapêuticos.

[00157] É sabido que a ligação de CTB a Gm1 envolve uma porção de galactose N-terminal a ligação de glicomolécula ramificada Gm1 a duas subunidades de CTB adjacentes. Portanto, é previsto que a galactose imobilizada em um suporte sólido apropriado deve prover um meio genérico para a purificação das proteínas recombinantes da presente invenção. Para avaliar a aplicabilidade dessa abordagem, o gene que codifica CTB foi clonado em um vetor de expressão de proteína bacteriana desenhado para a recuperação de proteína periplásmica ao usar técnicas familiares àquelas praticadas no estado da técnica, e transformadas em várias cepas de bactérias *E. coli*. A resina de galactose-sefarose (Figura 43) foi adquirida junto à Pierce (Pierce Cat. nº. 20372). Culturas de cinquenta mililitros de clones que expressam CTB nas cepas de *E. coli* XL1-Blue, BL21 e TG1 foram desenvolvidas e induzidas para expressar CTB recombinante durante toda a noite a 37°C. As células foram colhidas por meio de centrifugação e os meios clarificados foram retidos para a extração de CTB. Os teores periplásmicos dos pellets de células foram liberados por meio de choque osmótico ao usar métodos padrão familiares àqueles praticados no estado da técnica para se obter 10 mL por cultura.

[00158] A resina de sefarose galactose foi lavada com 200 mM de NaCl, 50 mM de Tris HCl, 5 mM de EDTA, pH 7,5 (tampão TEN) de acordo com instruções do fabricante. NaCl, Tris-HCl, pH 7,5, e EDTA foram adicionados ao meio condicionado e frações periplásmicas até uma concentração final de 200 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl e 5 mM de EDTA. 0,5 ml de sefarose galactose lavada foram adicionados a cada meio condicionado e fração periplásmica, e incubada com agitação a 4°C por 2-3 horas. A resina foi recuperada em colunas de

BioRad e lavada com 30 volumes de leito do tampão TEM gelado. A proteína ligada foi eluída ao resuspender a resina em 0,5 mL de galactose 1M em PBS e incubação por 10 minutos. A coluna foi drenada e o material eluído foi retido para a análise. A etapa de eluição foi repetida várias vezes, e as frações foram analisadas quanto à presença de CTB. Quase toda a proteína expressada de CTB foi encontrada no meio de cultura. As amostras do meio condicionado pela purificação e da fração periplásmica, junto com os eluados da coluna agrupados que contêm CTB purificado (do meio) foram analisadas por SDS-PAGE e comparadas com CTB marcado com His purificado por IMAC (Figura 44). Pode ser visto que CTB altamente purificado foi obtido a partir dos sobrenadantes da cultura de todas as três cepas, com as células de XL1-Blue propiciando os rendimentos mais elevados (raias 4, 7 e 10). A pureza se compara bem com aquela vista da purificação de IMAC (raia 11), e inclui proteína pentamérica significativa.

Modalidades Adicionais

[00159] Em uma outra modalidade ilustrativa, é aqui apresentada uma vacina compreende uma proteína recombinante homogênea para melhorar a apresentação de e aumentar o número de epítetos de antígeno de tumor como elementos de uma proteína recombinante imunogênica sintética. Em uma modalidade ilustrativa, uma vacina formada a partir de uma proteína recombinante que expressa toda ou partes de uma sequência de polipeptídeo e um antígeno do tumor é aqui descrita.

[00160] Em uma modalidade ilustrativa, as proteínas recombinantes aqui apresentadas podem incluir ou expressar uma proporção elevada da proteína derivada de uma sequência de antígenos de tumor e/ou epítopos dos mesmos, como uma função do peso molecular total. Esses epítopos de antígeno de tumor podem ser múltiplas cópias do

todo ou parte de um único antígeno de tumor, ou cópias do todo ou parte de mais de um antígeno de tumor diferente.

[00161] Em uma modalidade ilustrativa, a proteína recombinante é uma molécula de proteína imunogênica que expressa uma ou mais sequências que se desdobram em uma estrutura física expressando, por exemplo, uma ou mais sequências de uma proteína de toxina B de cólera (CT-B) de *Vibrio cholera* ou um equivalente sintético, e que expressa uma ou mais sequências de um ou mais antígenos de tumor ou partes dos mesmos.

[00162] Em uma modalidade ilustrativa, a sequência de antígeno de tumor pode incluir uma sequência de um Antígeno Específico da Próstata (PSA) ou parte do mesmo. Em outras modalidades ilustrativas, o antígeno de tumor pode incluir um comprimento total ou uma parte do mesmo de um ou mais dos seguintes antígenos de tumor, incluindo, mas não limitados a PSA e outros antígenos de tumor.

[00163] Em uma outra modalidade ilustrativa, é aqui apresentada uma proteína que compreende uma proteína recombinante homogênea para melhorar a apresentação de e aumentar o número de sítios de ligação do receptor como elementos de uma proteína recombinante imunogênica. Em uma modalidade ilustrativa, uma proteína recombinante que expressa toda ou partes de uma sequência de polipeptídeo e um receptor é aqui descrita.

[00164] Em uma modalidade ilustrativa, as proteínas recombinantes aqui apresentadas podem incluir ou expressar uma proporção elevada de uma sequência de proteína derivada de seus receptores e/ou sítios de ligação, como uma função do peso molecular total. Esses sítios de ligação podem ser múltiplas cópias de todo ou uma parte de único receptor, ou cópias de todo ou uma parte de mais de um receptor diferente.

[00165] Em uma modalidade ilustrativa, a proteína recombinante é uma molécula de proteína imunogênica que expressa uma ou mais sequências que se desdobram em uma estrutura física expressando, por exemplo, uma ou mais sequências de uma proteína de toxina B de cólera (CT-B) de *Vibrio cholera* ou um equivalente sintético, e que expressa uma ou mais sequências de um ou mais receptores ou partes dos mesmos.

[00166] Em uma modalidade ilustrativa, a sequência de receptor pode incluir uma sequência de um receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (Her2) ou para parte disso e/ou um receptor do fator do crescimento epidérmico humano 3 (Her3) ou uma parte do mesmo. Em outras modalidades ilustrativas, o receptor pode incluir um comprimento total ou parte do mesmo de um ou mais dos seguintes receptores, incluindo, mas sem ficar a eles limitados, Her2, Her3, e outros receptores.

[00167] Em outras modalidades ilustrativas, a proteína recombinante é uma molécula de proteína imunogênica que expressa uma ou mais sequências que se desdobram em uma estrutura física expressando, por exemplo, uma ou mais sequências de um CT-B ou uma variante modificada sintética, e que expressa várias combinações de uma ou mais sequências de um ou mais fatores de crescimento ou partes dos mesmos, uma ou mais sequências de um ou mais antígenos de tumor ou partes dos mesmos, e uma ou mais sequências de um ou mais receptores ou partes dos mesmos.

[00168] Em uma modalidade ilustrativa, a proteína recombinante inclui expressões ou sequências de um ou mais fatores de crescimento ou partes dos mesmos e um ou mais sequências de um ou mais antígenos de tumor ou partes dos mesmos. Em uma modalidade, a proteína recombinante inclui uma ou mais sequências de um CT-B ou uma variante modificada sintética, um PSA ou uma

parte do mesmo, e um IGF-1 ou uma parte do mesmo.

[00169] Em uma outra modalidade ilustrativa, a proteína recombinante inclui expressões ou sequências de um ou mais fatores de crescimento ou partes dos mesmos e uma ou mais sequências de um ou mais receptores ou partes dos mesmos. Em uma modalidade, a proteína recombinante inclui uma ou mais sequência de um CT-B ou uma variante modificada sintética, um Her2 ou uma parte do mesmo, e um Igf-1 ou uma parte do mesmo. Em uma outra modalidade, a proteína recombinante inclui uma ou mais sequências de um CT-B ou uma variante modificada sintética, um Her2 ou uma parte do mesmo, um Her2 ou uma parte do mesmo, e um PDGF ou uma parte do mesmo.

[00170] Em uma outra modalidade ilustrativa, a proteína recombinante inclui expressões ou sequências de um ou mais antígenos de tumor ou partes dos mesmos e uma ou mais sequências de um ou mais receptores ou partes dos mesmos.

[00171] Ainda em uma outra modalidade ilustrativa, a proteína recombinante inclui expressões ou sequências de um ou mais fatores de crescimento ou partes dos mesmos, uma ou mais sequências de um ou mais antígenos de tumor ou partes dos mesmos, e uma ou mais sequências de um ou mais receptores ou partes dos mesmos.

[00172] Em algumas das modalidades descritas acima, além de expressar uma ou mais cópias de um único antígeno de tumor, receptor e/ou fator de crescimento, apresentados como um único antígeno de tumor, receptor e/ou fator de crescimento ou parte dos mesmos por sítio físico, e/ou como cadeias de sequências de antígeno de tumor, receptor e/ou fator de crescimento repetitivas (por exemplo, n = 1 a 10). As proteínas recombinantes de acordo com a invenção também podem incluir expressões de um ou mais domínios neutralizadores ou sítios de ligação de dois ou mais antígenos de

tumor, receptores e/ou fatores de crescimento diferentes presentes individualmente ou como cadeias em posições diferentes dentro das sequências das proteínas recombinantes. Por exemplo, as proteínas recombinantes podem incluir expressões ou sequências de um comprimento total ou uma parte de dois a quatro antígenos de tumor, receptores e/ou fatores de crescimento diferentes, e/ou um comprimento total ou uma parte de um ou mais antígenos de tumor, receptores e/ou fatores de crescimento como epítopos individuais ou sítios de ligação ou como duas ou mais repetições em tandem.

[00173] As proteínas resultantes são polipeptídeos simples que expressam um antígeno de tumor, um receptor e/ou um fator de crescimento ou um ou mais epítopos ou sítios de ligação dos mesmos dentro da sequência das proteínas recombinante. Em uma modalidade ilustrativa, as sequências das proteínas recombinantes expressam uma ou mais parte de uma sequência de CT-B e apresentam a(s) expressão(ões) do antígeno de tumor, do receptor e/ou do fator de crescimento incluindo pelo menos uma ou mais expressões de epítopos ou sítios de ligação dos mesmos em uma superfície das proteínas recombinantes imunogênicas em uma conformação natural.

[00174] De acordo com a invenção, as expressões dos epítopos de antígeno do tumor, dos sítios de ligação do receptor, e/ou dos epítopos do fator de crescimento devem ser desdobrados, permitindo que a sua conformação natural seja retida substancialmente e apresentada aos componentes do sistema imunológico do hospedeiro de uma maneira tal que acarreta uma resposta imunológica robusta do hospedeiro. Os exemplos de modelos de proteínas naturais apropriados incluem, mas não estão limitados a subunidade de toxina B de cólera, listeria, toxoide do tétano, toxoide da difteria, proteína de revestimento de bacteriófago, adenovírus e outras proteínas de revestimento virais. Alternativamente, podem ser usados polipeptídeos 'sintéticos' não

naturais que preenchem os requisitos de conferir imunogenicidade à proteína integral e permitem a apresentação apropriada de epítopos de antígeno de tumor, sítios de ligação do receptor e/ou epítopos do fator de crescimento ao sistema imunológico do hospedeiro.

Adjuvante

[00175] Determinadas modalidades ilustrativas tal como aqui provido incluem proteínas recombinantes de acordo com a invenção dentro de composições de vacinas e composições adjuvantes imunológicas, incluindo composições farmacêuticas, que contêm, além das proteínas recombinantes pelo menos um adjuvante, que se refere a um componente de tais composições que tem uma atividade adjuvante. Um adjuvante que tem tal atividade adjuvante inclui uma composição que, quando administrada a um indivíduo tal como um ser humano (por exemplo, um paciente humano), um primata não humano, um mamífero ou um outro organismo eucariota mais elevado que tem um sistema imunológico reconhecido, tem a capacidade de alterar (isto é, aumentar ou diminuir de uma maneira estatisticamente significativa, e em determinadas modalidades preferidas realçar ou aumentar) a potência e/ou a longevidade de uma resposta imunológica. Em determinadas modalidades ilustrativas aqui apresentadas, um antígeno e/ou antígenos desejados contidos dentro de uma proteína carreadora, e opcionalmente um ou mais adjuvantes, podem desse modo alterar, por exemplo, prover ou realçar, uma resposta imunológica que seja dirigida contra o antígeno e/ou antígenos desejados que podem ser administrados ao mesmo tempo ou podem ser separados no tempo e/ou no espaço (por exemplo, em um sítio anatômico diferente) em sua administração, mas determinadas modalidades ilustrativas não devem ficar assim limitadas e desse modo também não contemplam a administração da proteína recombinante em uma composição que não inclua um antígeno

especificado mas que também pode incluir mas sem nenhuma limitação a um ou mais coadjuvantes, um modificador da resposta imunológica de imidazoquinolina.

[00176] Por conseguinte, e tal como observado acima, os adjuvantes incluem composições que têm efeitos adjuvantes, tais como saponinas e miméticos de saponina, incluindo QS21 e o miméticos de QS21 (vide, por exemplo, as Patentes U.S. nº. 5.057.540; EP 0 362 279 Bl; WO 95/17210), alúmen, alcaloides de plantas tais como a tomatina, detergentes tais como (mas sem ficar a eles limitados) a saponina, polisorbato 80, Span 85 e estearil tirosina, uma ou mais citocinas (por exemplo, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-alfa, IFN-gama), um modificador da resposta imunológica de imidazoquinolina, e um modificador imunológico de alça de ramo duplo (dSLIM, por exemplo, Weeratna *et al.*, Vaccine 2005 23:5263).

[00177] Os detergentes que incluem as saponina são apresentados, por exemplo, na Patente U.S. nº. 6.544.518; Lacaille-Dubois, M e Wagner H. (1996 Phytomedicine 2:363-386), na Patente U.S. nº 5.057.540, Kensil, Crit. Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55, e EP 0 362 279 B1. As estruturas particuladas, denominadas Complexos Imuno Estimulantes (ISCOMS), que compreendem frações de Quil A (saponina) são hemolíticas e são usadas na fabricação de vacinas (Morein, B., EP 0 109942 B1). Essas estruturas foram relatadas como dotadas de uma atividade adjuvante (EP 0 109 942 B 1; WO 96/11711). As saponinas hemolíticas QS21 e QS 17 (frações purificadas por HPLC de Quil A) foram descritas como potentes adjuvantes sistêmicos, e o método de sua produção é apresentado nas Patentes U.S. nº. 5.057.540 e EP 0 362 279 B1. Nessas referências também é descrito o uso de QS7 (uma fração não hemolítica de Quil-A) que age como um potente adjuvante para vacinas sistêmicas. O uso de QS21 também é descrito em Kensil *et al.*

(1991. J. Immunology 146:431-437). As combinações de QS21 e de polissorbato ou ciclodextrina também são conhecidas (WO 99/10008). Os sistemas adjuvantes particulados que compreendem frações de Quil-A, tais como QS21 e QS7, são descritos nos documentos de patente WO 96/33739 e WO 96/1171l. Outras saponinas que são usadas em estudos de vacinação sistêmica incluem aqueles derivados de outras espécies de plantas tais como Gypsophila e Saponaria (Bomford *et al.*, Vaccine, 10(9):572- 577, 1992).

[00178] A escina é um outro detergente relacionado às saponinas para o uso nas composições adjuvantes das modalidades aqui apresentadas. A escina é descrita no índice da Merck (l2. sup. th Ed.: entrada 3737) como uma mistura de saponina que ocorre na semente da árvore de castanha de cavalo, *Aesculus hippocastanum*. O seu isolamento é descrito por meio de cromatografia e purificação (Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)), e por resinas de troca de íons (Erbring *et al.*, Patente U.S. nº 3.238.190). As frações de escina (também conhecida como aescina) foram purificadas e foi mostrado que são biologicamente ativas (Yoshikawa M, *et al.* (Chem Pharm Bull (Tokyo) 1996 Agosto; 44(8): 1454-1464)). A digitonina é um outro detergente, também descrito no índice da Merck (l2ª Ed., entrada 3204) como uma saponina, que é derivada das sementes de *Digitalis purpurea* e purificada de acordo com o procedimento descrito por Gisvold *et al.*, J. Am. Pharm. Assoc., 1934, 23, 664; e Rubenstroth-Bauer, Physiol. Chem., 1955, 301, 621.

[00179] Outros adjuvantes ou coadjuvantes para o uso de acordo com determinadas modalidades aqui apresentadas incluem um copolímero de bloco ou um polímero biodegradável, que se refere a uma classe de compostos poliméricos com os quais os elementos versados na técnica devem ser familiarizados. Os exemplos de um copolímero de bloco ou de um polímero biodegradável que pode ser

incluído em uma composição de vacina ou um adjvante imunológico incluem Pluronic.RTM.LI21 (BASF Corp., Mount Olive, New Jersey; vide, por exemplo, Yeh *et al.*, Pharm 1996. Res. 13:1693).

[00180] Determinadas outras modalidades ilustrativas contemplam os adjuvantes imunológicos que incluem, mas não estão limitados a um óleo, que em algumas de tais modalidades pode contribuir para a atividade de coadjuvante e em outras tais modalidades pode prover adicional ou alternativamente um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável. Qualquer número de óleos apropriados é conhecido e pode ser selecionado para a inclusão em composições de vacina e nas composições adjuvantes imunológicas com base na presente invenção. Os exemplos de tais óleos, a título de ilustração e não de limitação, incluem o esqualeno, o esqualano, o óleo mineral, o azeite de oliva, o colesterol, e um monooleato de manida.

[00181] Os modificadores da resposta imunológica tais como modificadores da resposta imunológica de imidazoquinolina também são conhecidos no estado da técnica e também podem ser incluídos como adjuvantes ou coadjuvantes em determinadas modalidades atualmente apresentadas.

[00182] Também tal como observado acima, um tipo de adjuvante ou coadjuvante para o uso em uma composição de vacina de acordo com a invenção tal como aqui descrito pode incluir os coadjuvantes de alumínio, que são conhecidos de modo geral como "alúmen". Os coadjuvantes de alúmen são baseados no que segue: oxihidróxido de alumínio; hidroxifosfato de alumínio; ou vários sais proprietários. Os coadjuvantes de alúmen são vantajosos porque eles têm um bom registro de segurança, aumentam as respostas a anticorpo, estabilizam antígenos, e são relativamente simples para a produção em grande escala. (Edelman 2002 Mol. Biotechnol. 21:129-148; Edelman, R. Rev. 1980 Infect. Dis. 2:370-383).

Composições Farmacêuticas

[00183] Em determinadas modalidades ilustrativas, a composição farmacêutica é uma composição de vacina que compreende Proteína recombinante, de acordo com a invenção e também pode compreender um ou mais componentes, tal como aqui provido, que são selecionados de agonistas de TLR, coadjuvantes (incluindo, por exemplo, uma citocina, um modificador de resposta imunológica de imidazoquinolina e/ou dSLIM) e outros ainda e/ou uma construção de expressão recombinante, em combinação com um veículo, excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[00184] Os veículos ilustrativos serão atóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações empregadas. Para as vacinas que compreendem a proteína recombinante, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 100 mg/kg do peso do corpo serão administrados, tipicamente pela via intradermal, subcutânea, intramuscular ou intravenosa, ou por outras vias.

[00185] Será evidente para aqueles versados na técnica que o número e a frequência de administração serão dependentes da resposta do hospedeiro. Os "veículos farmaceuticamente aceitáveis" para o uso terapêutico são bem conhecidos na técnica farmacêutica, e descritos, por exemplo, Remington’s Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Por exemplo, solução salina estéril e solução salina tamponada com fosfato a um pH fisiológico podem ser usadas. Conservantes, estabilizantes, corantes e até mesmo agentes flavorizantes podem ser providos na composição farmacêutica. Por exemplo, o benzoato de sódio, o ácido ascórbico e os ésteres de ácido p-hidroxibenzoico podem ser adicionados como conservantes. Além disso, antioxidantes e agentes de suspensão podem ser usados.

[00186] As composições farmacêuticas podem estar em qualquer

forma que permita que a composição seja administrada a um paciente. Por exemplo, a composição pode estar na forma de um sólido, um líquido ou um gás (aerossol). As vias de administração típicas incluem, sem limitação, oral, tópica, parenteral (por exemplo, sublingual ou bucal), sublingual, retal, vaginal e intranasal (por exemplo, como um spray). O termo parenteral, tal como aqui usado, inclui a administração iontoforética, sonoforética, transdérmica passiva, com microagulha e também injeções subcutâneas, injeção intravenosa, intramuscular, intrasternal, intracavernosa, intratecal, intrameatal, intrauretral ou técnicas de infusão. Em uma modalidade particular, uma composição tal como aqui descrito (incluindo composições de vacina e farmacêuticas) é administrada intradermicamente por uma técnica selecionada da iontoforese, da microcavitação, da sonoforese ou com microagulhas.

[00187] A composição farmacêutica é formulada para permitir que os ingredientes ativos contidos na mesma fiquem biodisponíveis com a administração da composição a um paciente. As composições que serão administradas a um paciente assumem a forma de uma ou mais unidades de dosagem, onde, por exemplo, um comprimido pode ser uma única unidade de dosagem, e um recipiente de um ou mais compostos da invenção na forma de aerossol pode conter uma pluralidade de unidades de dosagem.

[00188] Para a administração oral, um excipiente e/ou um aglutinante podem estar presentes. Os exemplos são a sacarose, o caulim, a glicerina, dextrinas de amido, alginato de sódio, carbóxi metil celulose e etila celulose. Agentes corantes e/ou flavorizantes podem estar presentes. Um envoltório de revestimento pode ser empregado.

[00189] A composição pode estar na forma de um líquido, por exemplo, um elixir, um xarope, uma solução, uma emulsão ou uma suspensão. O líquido pode ser para a administração oral ou para a

aplicação por injeção, como dois exemplos. Quando se prestam à administração oral, as composições preferidas contêm um ou mais de um agente adoçante, conservante, tintura/corante e intensificador do sabor. Em uma composição destinada a ser administrada por injeção, um ou mais de um tensoativo, um conservante, um agente umectante, um agente de dispersão, um agente de suspendendo, um agente tampão, um estabilizante e um agente isotônico podem ser incluídos.

[00190] Uma composição farmacêutica líquida tal como aqui usado, quer esteja na forma de uma solução, suspensão ou outra forma similar, pode incluir um ou mais dos seguintes veículos ou excipientes: diluentes estéreis tais como a água para injeção, solução saline, de preferência solução salina fisiológica, solução de Ringer, cloreto de sódio isotônico, óleos fixos tais como o esqualeno, o esqualano, o óleo mineral, um monooleato de manida, colesterol, e/ou mono ou diglicerídeos sintéticos que podem servir como solvente ou meio de suspensão, polietileno glicóis, a glicerina, propileno glicol ou outros; agentes bactericidas tais como o álcool benzílico ou o metil parabeno; antioxidantes tais como o ácido ascórbico ou o bissulfito de sódio; agentes de quelação tais como o ácido etileno diamina tetraacético; agentes tampão tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade tais como o cloreto de sódio ou a dextrose. O preparado parenteral pode ser encerrado em ampolas, em seringas descartáveis ou em frascos de múltiplas doses feitos de vidro ou de plástico. Uma composição farmacêutica injetável é de preferência estéril.

[00191] Em uma modalidade particular, uma composição farmacêutica ou de vacina da invenção compreende uma suspensão aquosa estável de menos de 0,2 μm e também compreende pelo menos um componente selecionado do grupo que consiste em fosfolipídios, ácidos graxos, tensoativos, detergentes, saponinas,

lipídeos fluoretados, e outros ainda.

[00192] Também pode ser desejável a inclusão de outros componentes em uma composição de vacina ou farmacêutica, tais como os veículos de aplicação que incluem, mas sem ficar a eles limitados, sais de alumínio, emulsões de água em óleo, veículos de óleo biodegradável, emulsões de óleo em água, microcápsulas biodegradáveis e lipossomas. Os exemplos de substâncias imunoestimuladoras adicionais (coadjuvantes) para o uso em tais veículos também são descritos acima e podem incluir N-acetilmuramil-L-alanina-O-isoglutamina (MOP), glucano, IL-12, GM-GSF, gama interferon e IL-12.

[00193] Embora qualquer veículo apropriado conhecido daqueles versados na técnica possa ser empregado nas composições farmacêuticas da presente invenção, o tipo de veículo irá variar dependendo do modo de administração e se uma liberação sustentada é desejada. Para a administração parenteral, tal como a injeção subcutânea, o veículo compreende de preferência a água, solução salina, álcool, uma gordura, uma cera ou um agente tampão. Para a administração oral, qualquer um dos veículos acima ou um veículo sólido, tal como o manitol, a lactose, o amido, o estearato de magnésio, a sacarina sódica, o talco, a celulose, a glicose, a sacarose e o carbonato de magnésio, pode ser empregado. Microesferas biodegradáveis (por exemplo, galactídeo poliláctico) também podem ser empregados como veículos para as composições farmacêuticas da presente invenção.

[00194] As composições farmacêuticas também podem conter diluentes tais como agentes tampão, antioxidantes tais como o ácido ascórbico, polipeptídeos de baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos), proteínas, aminoácidos, carboidratos incluindo a glicose, a sacarose ou dextrinas, agentes de quelação tais como

EDTA, glutationa e outros estabilizantes e excipientes. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina de soro não específico são diluentes apropriados exemplificadores. De preferência, o produto pode ser formulado como um liofilizado ao usar soluções ao usar soluções de excipientes apropriadas (por exemplo, sacarose) como diluentes.

[00195] Em uma modalidade ilustrativa, o domínio de suporte do epítopo ou receptor da proteína recombinante, se for derivado de uma sequência de polipeptídeo natural ou sintética, deve ter a capacidade automontagem como multímeros oligoméricos sob condições químicas/ambientais apropriadas, ou ser reduzido em monômeros sob condições alternativas. Idealmente, os domínios de multimerização irão ser montados como multímeros estáveis com um número distinto de subunidade, por exemplo, dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros, etc., de maneira tal que, um produto de tamanho homogêneo é gerado. Os exemplos de polipeptídeos naturais incluem, mas não estão limitados a zíperes de leucina, proteína repressora de lac, estreptavidina/avidina, subunidade de toxina B de cólera, domínio de trimerização de *Pseudomonas*, e proteínas de capsídeos virais.

[00196] Em uma modalidade ilustrativa, é apresentado um processo de preparação de uma molécula multivalente. Nessa modalidade ilustrativa, o processo inclui a montagem de multímeros a partir de subunidades monoméricas para formar uma proteína sintética que inclui um ou mais antígeno de tumor, receptores e/ou fatores de crescimento ou partes dos mesmos.

[00197] Em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentado um processo de preparação de uma formulação de vacina. Nessa modalidade ilustrativa, o processo inclui a mistura de um ou mais multímeros monovalentes simples uns aos outros, preparando uma vacina multivalente que inclui uma proteína recombinante que inclui

um ou mais antígenos de tumor, receptores e/ou fatores de crescimento ou partes dos mesmos.

[00198] Ainda em uma outra modalidade ilustrativa, é apresentado um processo para o tratamento de um paciente. Nessa modalidade ilustrativa, o processo inclui a administração separada ao paciente de um ou mais antígenos de tumor, receptores e/ou fatores de crescimento monovalentes, proteínas recombinantes em um mesmo dia ou em dias ou horários alternados durante um período de vacinação.

[00199] Embora a proteína recombinante tenha sido descrita como incluindo ou expressando um ou mais de toda ou uma parte de pelo menos uma sequência de antígenos de tumor, fatores de crescimento, e/ou receptores, e a sequência de CT-B, a proteína recombinante pode incluir a sequência de CT-B natural ou uma sequência substancialmente similar à sequência de CT-B natural e/ou uma sequência sintética.

[00200] Embora a proteína recombinante tenha sido descrita como incluindo ou expressando a sequência de CT-B, a proteína recombinante pode incluir ou expressar uma derivação da sequência de CT-B ou uma sequência que é substancialmente similar à sequência de CT-B.

[00201] Embora as proteínas recombinantes homogêneas que expressam ou que incorporam um ou mais antígenos de tumor, fatores de crescimento e/ou receptores tenham sido descritas e ilustradas em conexão com determinadas modalidades, muitas variações e modificações serão evidentes àqueles versados na técnica e podem ser feitas sem que se desvie do caráter e âmbito da invenção. A invenção não deve desse modo ficar limitada aos detalhes precisos da metodologia ou da construção apresentadas acima, uma vez que tais variações e modificações devem ser incluídas dentro do âmbito da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende:

uma sequência de polipeptídeo imunogênico incluindo toxina B do cólera (CT-B) ou subunidade LT B termolábil de *E. coli* (LT-B);

um peptídeo espaçador selecionado a partir do grupo consistindo em SSGGGSGG (SEQ ID NO: 8), SSGGGGSGGG (SEQ ID NO: 9), TSGGGSG (SEQ ID NO: 10), TSGGGGSGG (SEQ ID NO: 11), SSGGGSGGGSSG (SEQ ID NO: 12), GGSGGTSGGGSG (SEQ ID NO: 13), SGGTSGGGGSGG (SEQ ID NO: 14), GGSGGTSGGGGSGG (SEQ ID NO: 15), SSGGGGSGGGSSG (SEQ ID NO: 16), SSGGGSGGGSSGGG (SEQ ID NO: 17), SSGGGGSGGGSSGGG (SEQ ID NO: 18) e GGSGGTRPSTAATS (SEQ ID NO: 19); e

uma sequência de polipeptídeo compreendendo Cys6 a Cys31 do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF),

em que a referida sequência de polipeptídeo é separada do referido polipeptídeo imunogênico pelo referido espaçador de peptídeo.

2. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida sequência de polipeptídeo imunogênico compreende ainda uma sequência compreendendo pelo menos uma porção de um antígeno tumoral.

3. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida sequência de polipeptídeo imunogênico compreende ainda uma sequência compreendendo pelo menos uma porção de um receptor ou compreende ainda uma sequência compreendendo pelo menos uma porção de um antígeno tumoral e uma sequência compreendendo pelo menos uma porção de um receptor.

4. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos a referida sequência de polipeptídeo inclui uma alça B de um fator de crescimento epidérmico (EGF).

5. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende uma porção comprimento total de pelo menos dois diferentes fatores de crescimento, opcionalmente como um domínio único ou como duas ou mais repetições em tandem.

6. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que compreende uma porção ou comprimento total de um ou mais fatores de crescimento selecionados a partir do grupo consistindo em IGF-1, IGF-2, FGF1, FGF2, TGF-α, TGF-β, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PDGF, NGF, EGF, HGF, BMPs, e ILs 1-6.

7. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que pelo menos a referida porção do referido antígeno tumoral inclui um comprimento total ou uma porção de dois a quatro antígenos tumorais diferentes, ou um comprimento total ou uma porção de um ou mais antígenos tumorais presentes como epítopos únicos ou como duas ou mais repetições em tandem.

8. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que pelo menos a referida porção do referido receptor inclui um comprimento total ou uma porção do Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (Her2) ou Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 3 (Her3).

9. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o referido receptor inclui um

comprimento total ou uma porção do Receptor de dois a quatro receptores diferentes, ou um comprimento total ou uma porção de um ou mais receptores como epítopos únicos ou dois ou mais repetições em tandem.

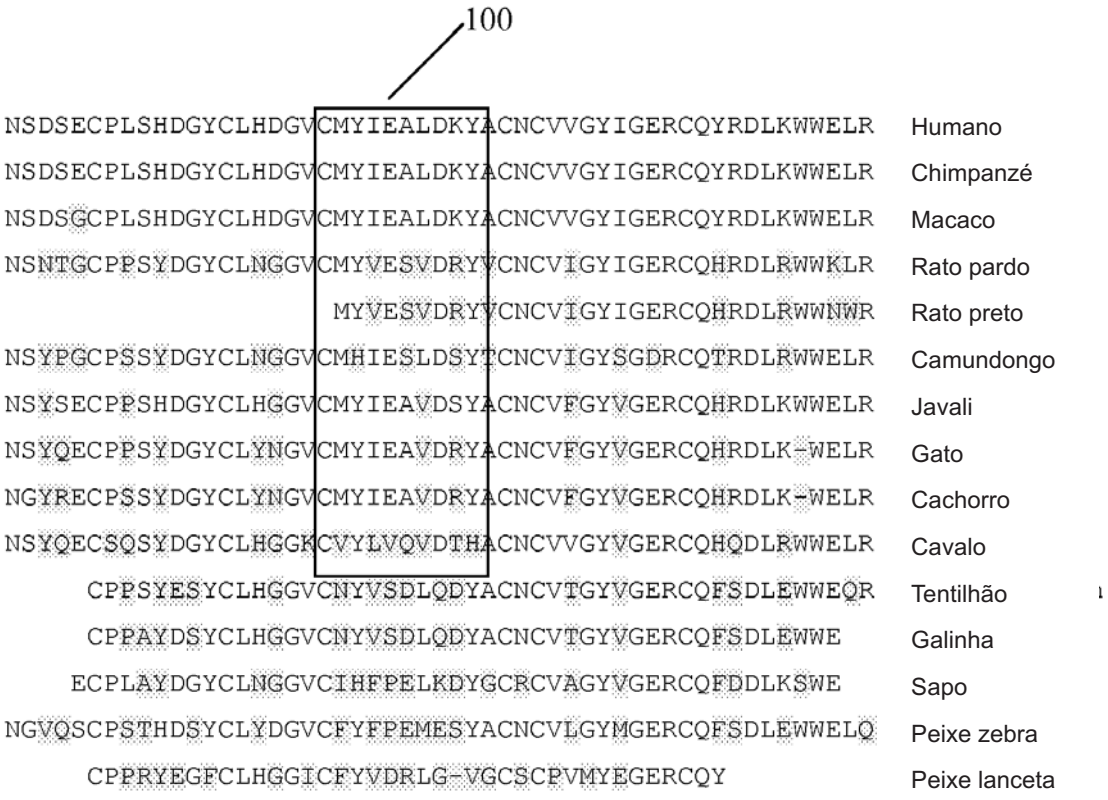

100
NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR Humano
NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR Chimpanzé
NSDSGCPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR Macaco
NSNTGCPPSYDGYCLNGGVCMYVESVDRYVCNCVIGYIGERCQHRDLRWWKLR Rato pardo
MYVESVDRYVCNCVIGYIGERCQHRDLRWWNWR Rato preto
NSYPGCPSSYDGYCLNGGVCMHIESLDSYTCNCVIGYSGDRCQTRDLRWWELR Camundongo
NSYSECPPSHDGYCLHGGVCMYIEAVDSYACNCVFGYVGERCQHRDLKWWELR Javali
NSYQECPPSYDGYCLYNGVCMYIEAVDRYACNCVFGYVGERCQHRDLK-WELR Gato
NGYRECPSSYDGYCLYNGVCMYIEAVDRYACNCVFGYVGERCQHRDLK-WELR Cachorro
NSYQECSQSYDGYCLHGGKCVYLVQVDTHACNCVVGYVGERCQHQDLRWWELR Cavalo
CPPSYESYCLHGGVCNYVSDLQDYACNCVTGYVGERCQFSDLEWWEQR Tentilhão
CPPAYDSYCLHGGVCNYVSDLQDYACNCVTGYVGERCQFSDLEWWE Galinha
ECPLAYDGYCLNGGVCIHFPELKDYGCRCVAGYVGERCQFDDLKSWE Sapo
NGVQSCPSTHDSYCLYDGVCFYFPEMESYACNCVLGYMGERCQFSDLEWWELQ Peixe zebra
CPPRYEGFCLHGGICFYVDRLG-VGCSCPVMYEGERCQY Peixe lanceta

FIG. 1

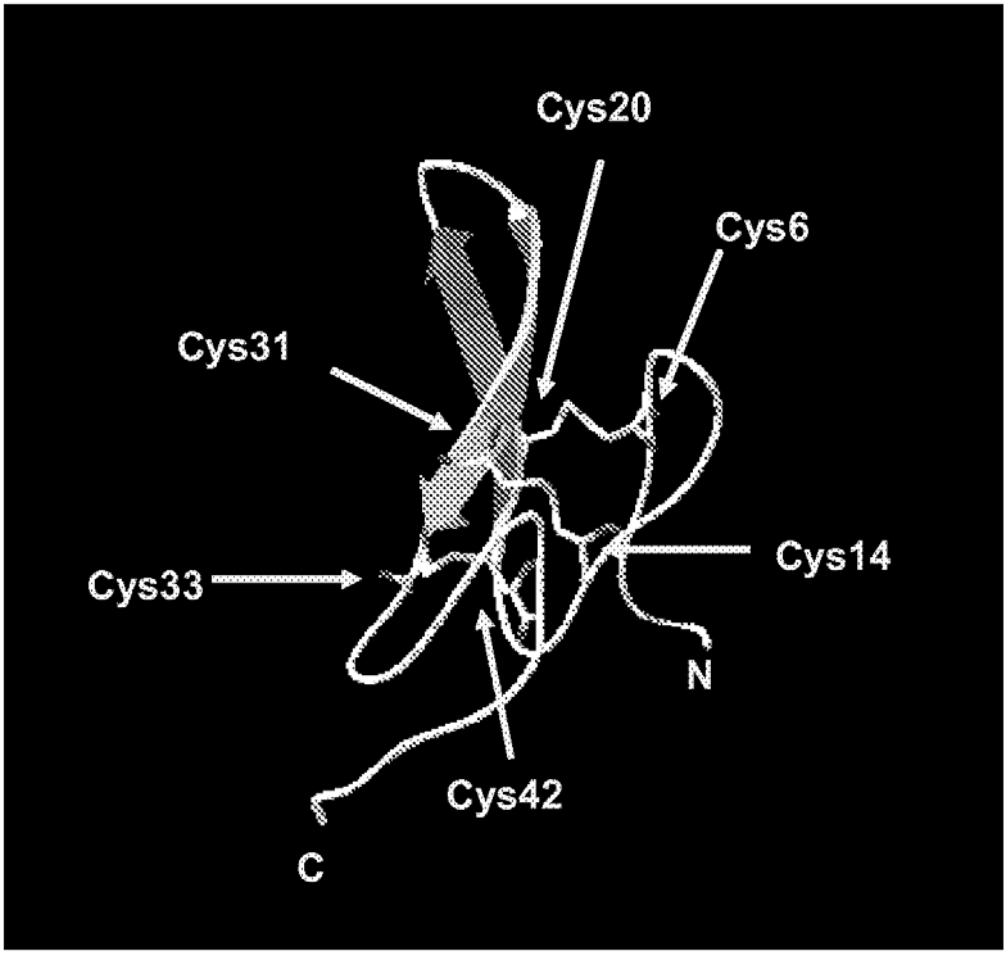


FIG. 2

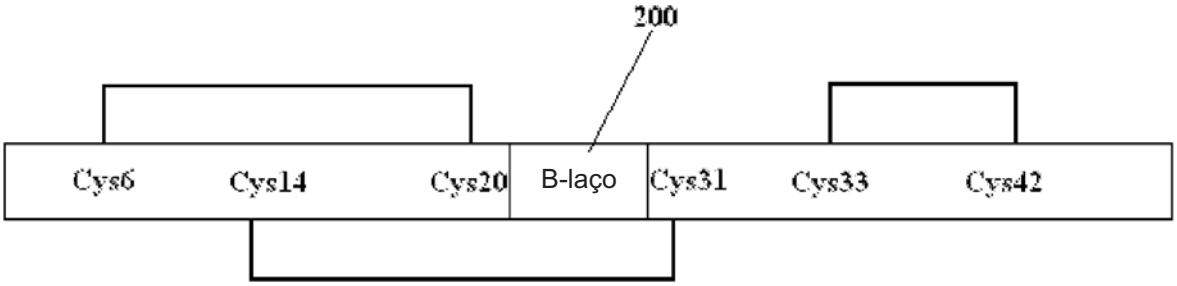


FIG. 3

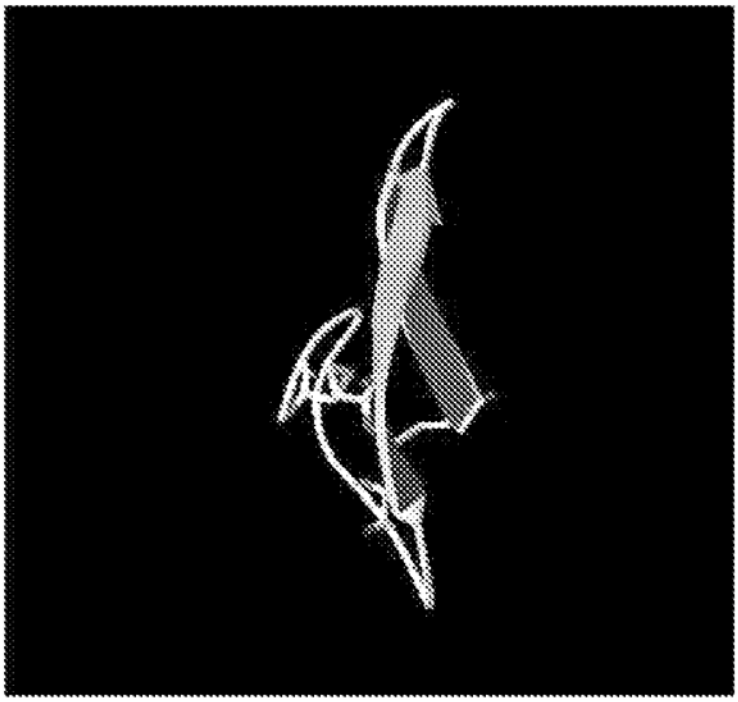


FIG. 4

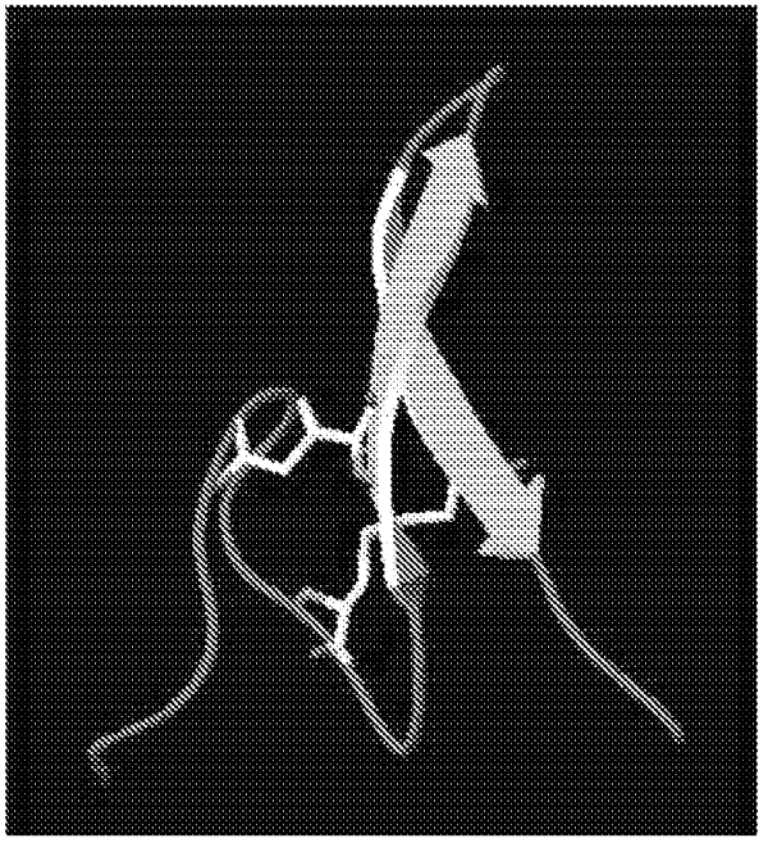


FIG. 5

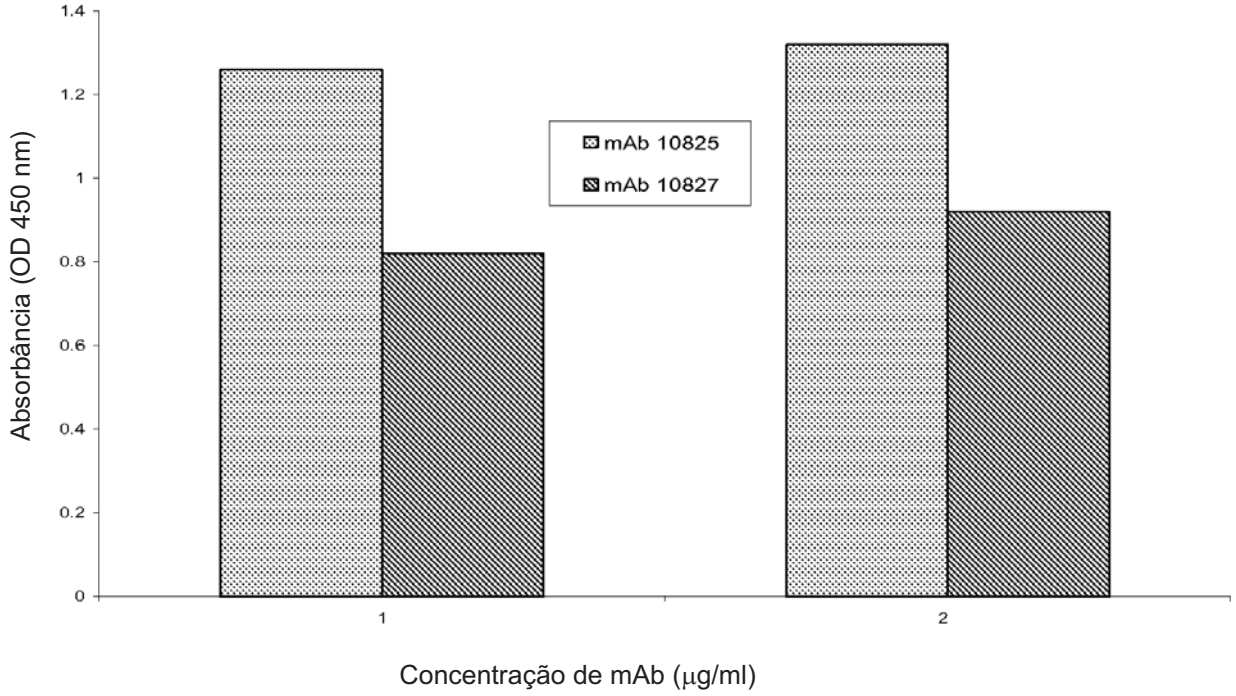

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Absorbância (OD 450 nm)
mAb 10825
mAb 10827
1
2
Concentração de mAb (μg/ml)

FIG. 6

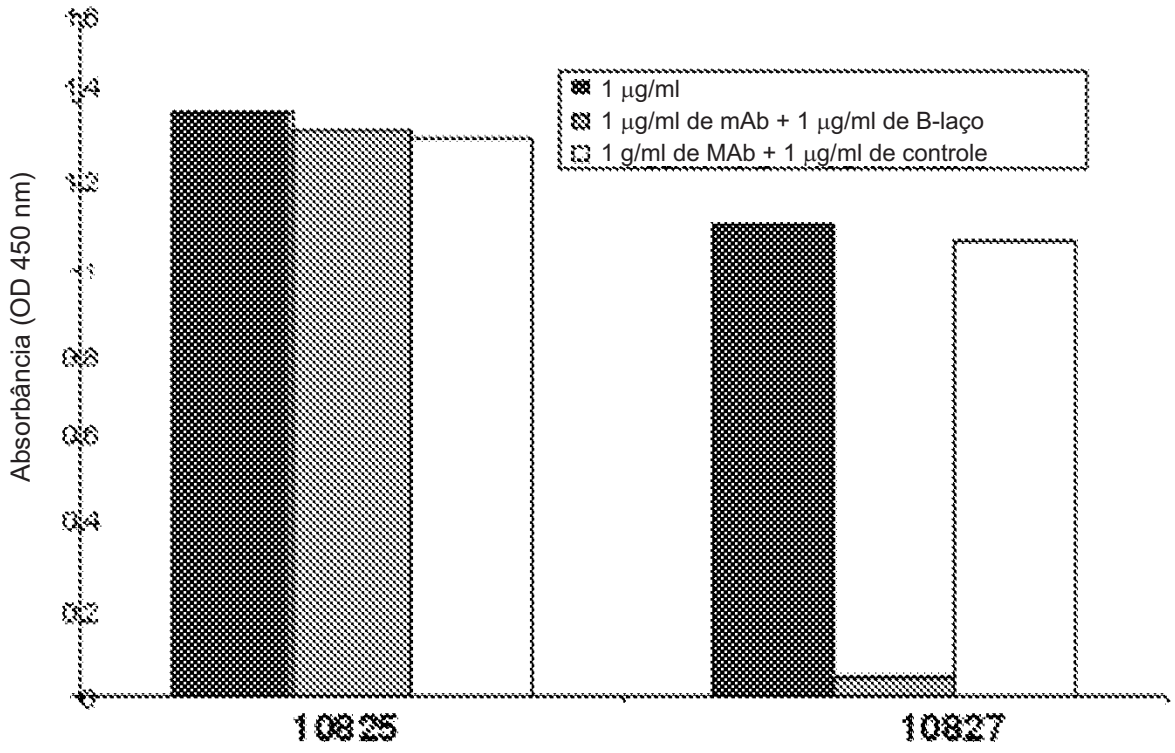

Absorbância (OD 450 nm)
1 μg/ml
1 μg/ml de mAb + 1 μg/ml de B-laço
1 g/ml de MAb + 1 μg/ml de controle
10825
10827

FIG. 7

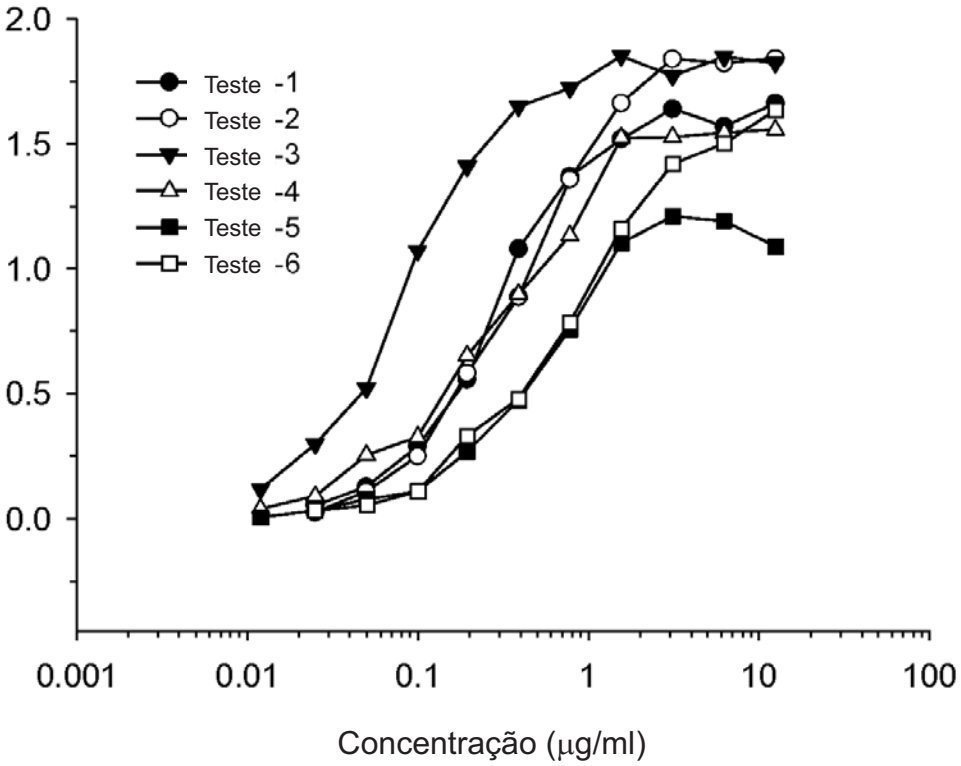

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Teste -1
Teste -2
Teste -3
Teste -4
Teste -5
Teste -6
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentração (μg/ml)

FIG. 8

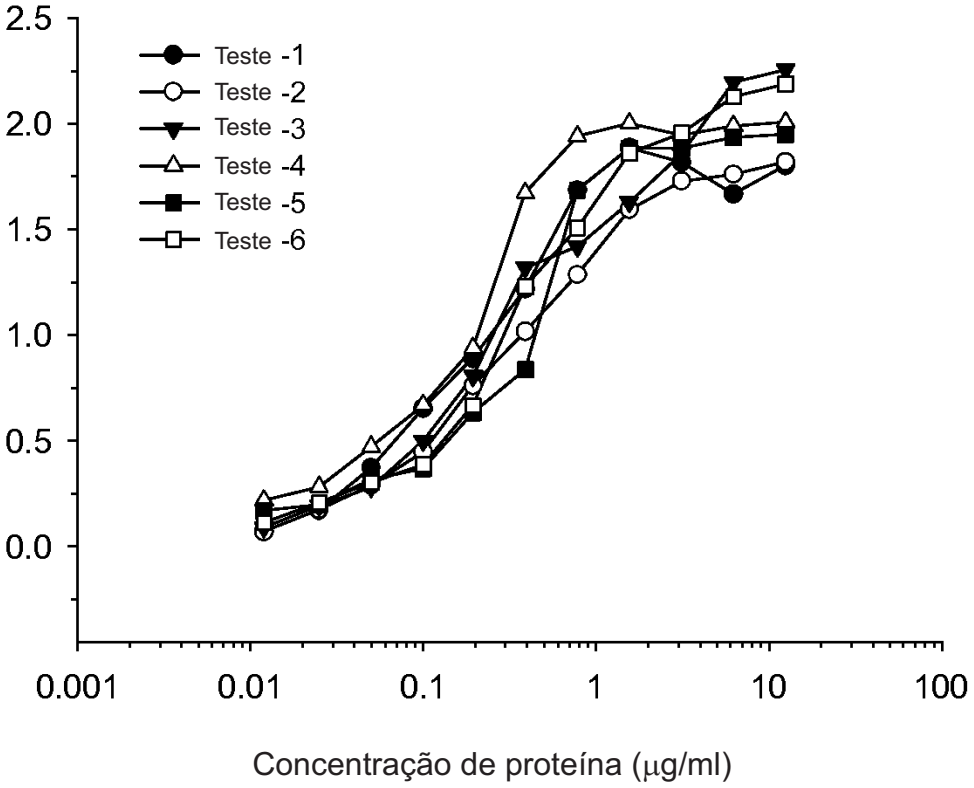

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Teste -1
Teste -2
Teste -3
Teste -4
Teste -5
Teste -6
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentração de proteína (μg/ml)

FIG. 9

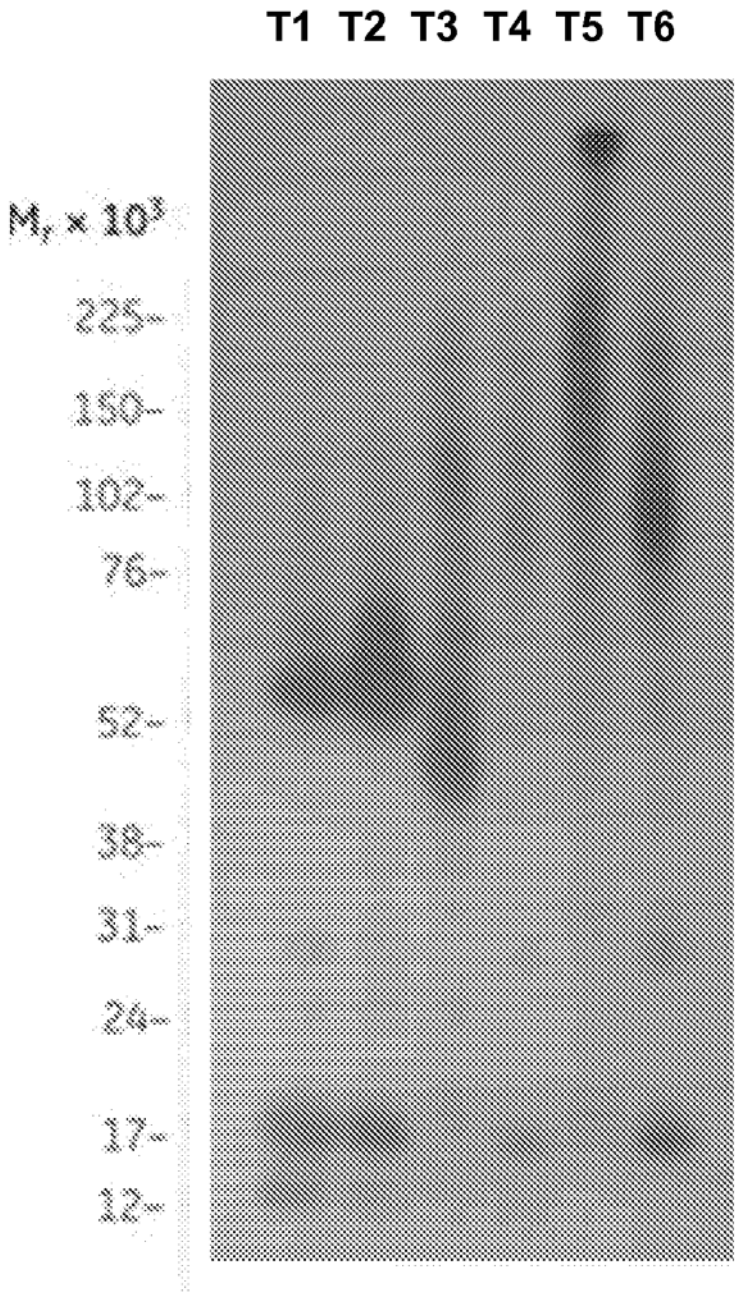


FIG. 10

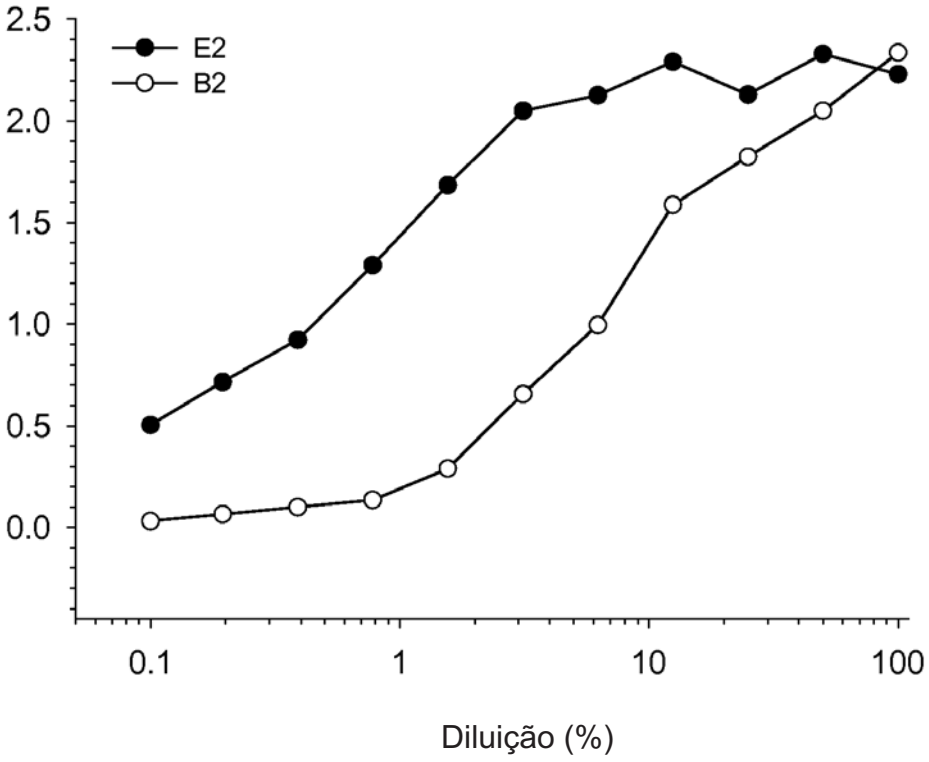

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
E2
B2
0.1
1
10
100
Diluição (%)

FIG. 11

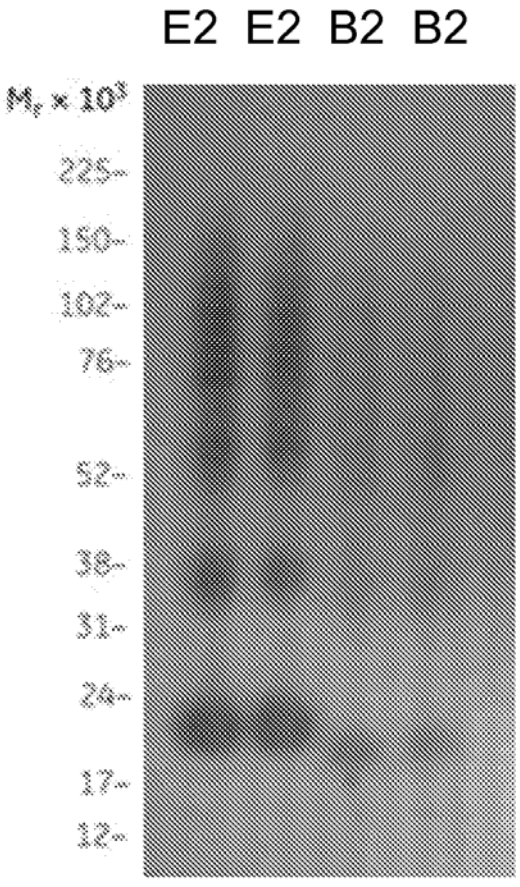

E2 E2 B2 B2
$M_r \times 10^3$
225
150
102
76
52
38
31
24
17
12

FIG. 12

H H H H H H I E G R N S D S E C P L S H D G Y C L H D G V C M Y I E A L D K Y A C N C V V G Y I G E R C Q Y R D L K W W E L R S G G *T P Q N I T D L C A E Y H N T Q I H T L N D K I F S Y T E S L A G K R E M A I I T F K N G A T F Q V E V P G S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I A Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A I A A I S M A N* S S G N S D S E C P L S H D G Y C L H D G V C M Y I E A L D K Y A C N C V V G Y I G E R C Q Y R D L K W W E L R

FIG. 13

H H H H H H I E G R C M Y I E A L D K Y S G G *T P Q N I T D L C A E*
Y H N T Q I H T L N D K I F S Y T E S L A G K R E M A I I T F K N G A T F Q V
E V P G S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I A Y L T E A K V E K L C V W
N N K T P H A I A A I S M A N S S G C M Y I E A L D K Y

FIG. 14

HHHHHHIEGRCPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDK
YACSGGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAG
KREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDT
LRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANSSGCPLS
HDGYCLHDGVCMYIEALDKYAC

FIG. 14 (Continuação)

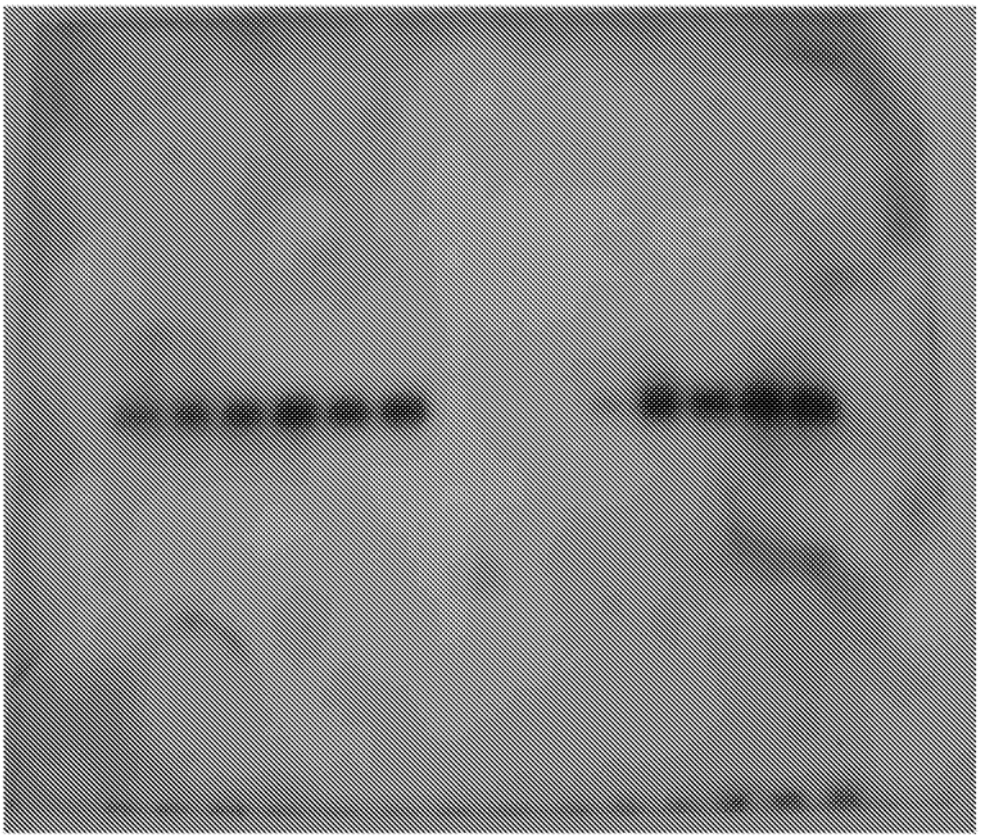


FIG. 15

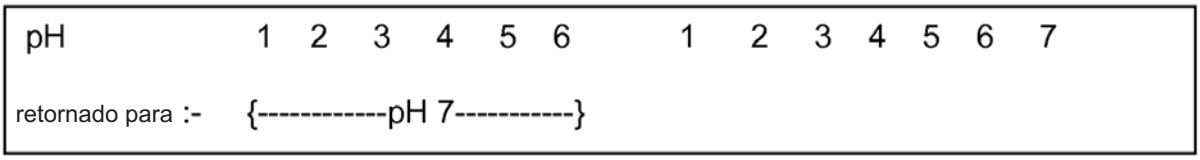


FIG. 16

Construto	Sequência
T1	EGF fundido diretamente ao terminal N de CT-B
T2	EGF fundido ao terminal N de CT-B e separado de CT-B por 3 ligantes de aminoácido
T3	EGF fundido ao terminal N de CT-B e separado de CT-B por 5 ligantes de aminoácido
T4	EGF fundido diretamente ao terminal C de CT-B
T5	EGF fundido ao terminal C de CT-B e separado de CT-B por 3 ligantes de aminoácido
T6	EGF fundido ao terminal C de CT-B e separado de CT-B por 5 ligantes de aminoácido
E2	EGF de comprimento total em ambos os terminais de CT-B, cada qual separado do CT-B por 3 ligantes de aminoácido
B2	EGF truncado (por exemplo, a sequência de EGF de Cys6 a Cys31) em ambos os terminais de CT-B, cada qual separado do CT-B por 3 ligantes de aminoácido

FIG. 17

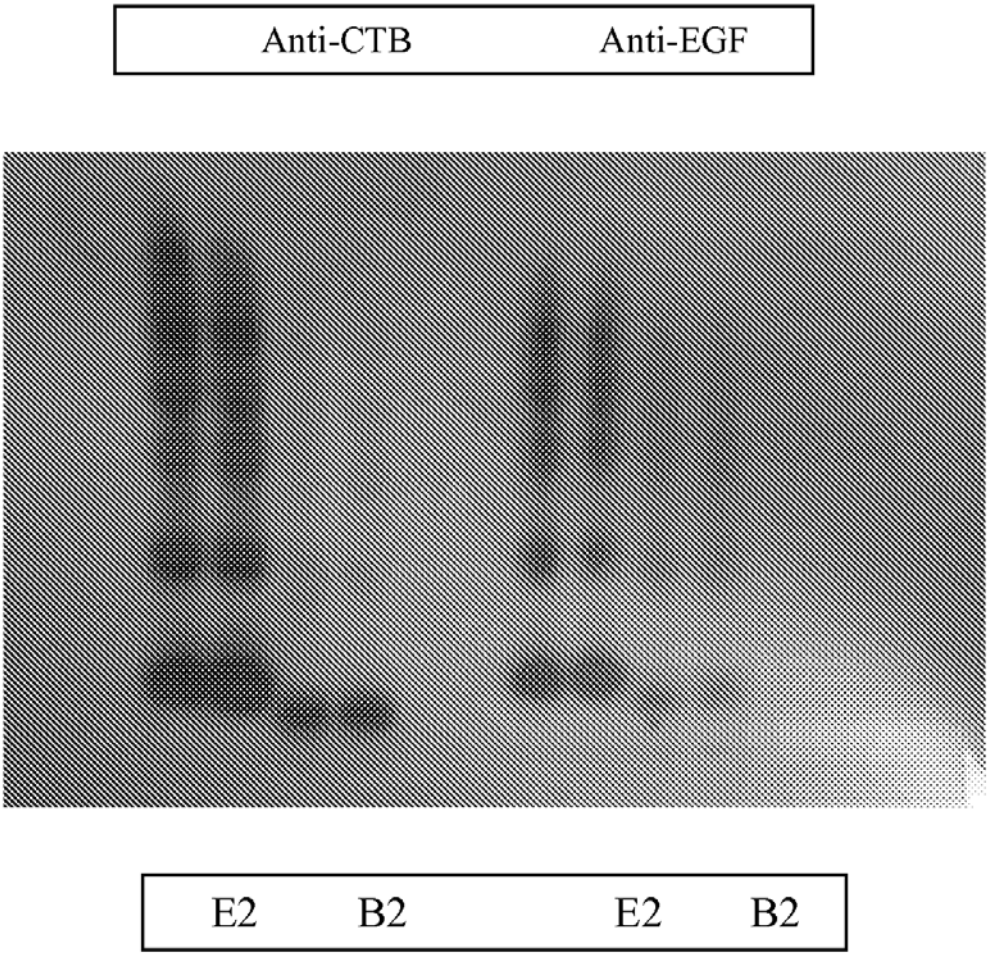


FIG. 18

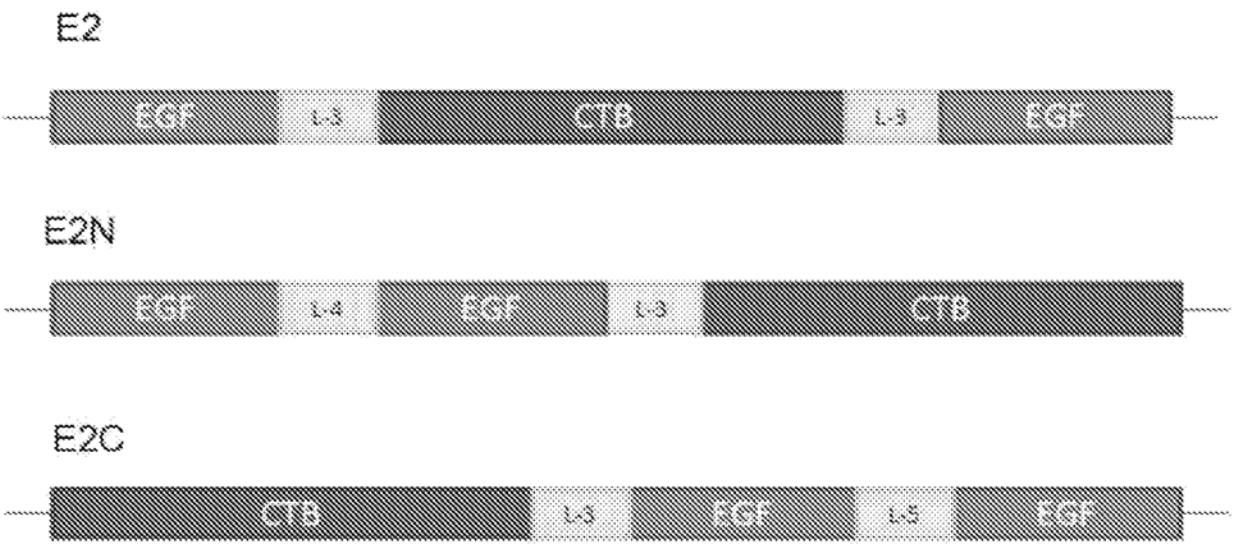


FIG. 19

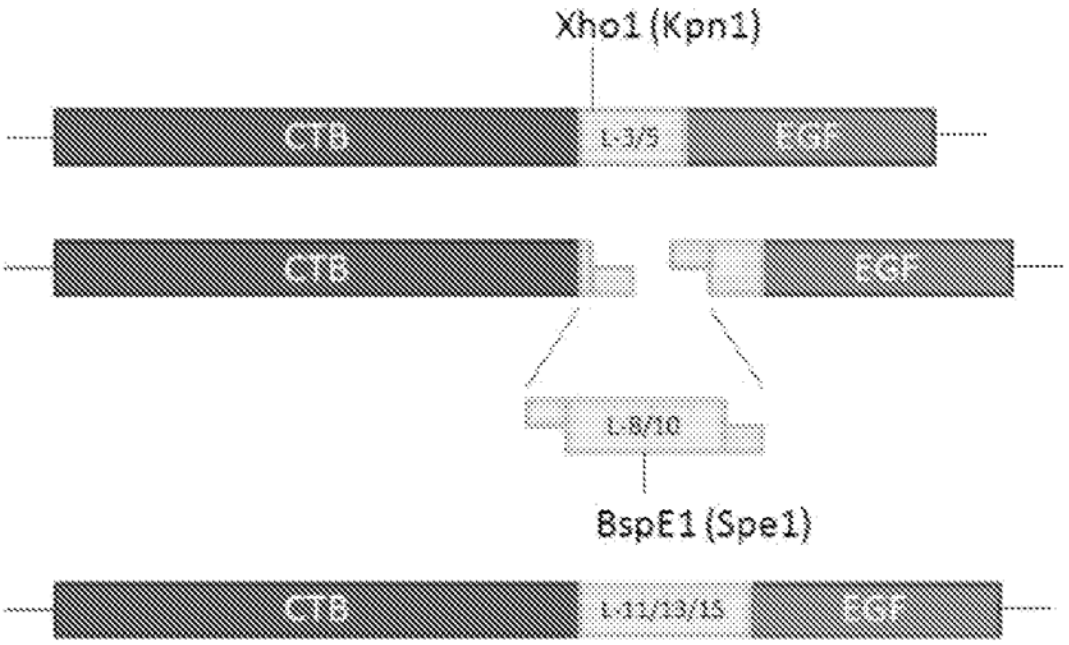


FIG. 20

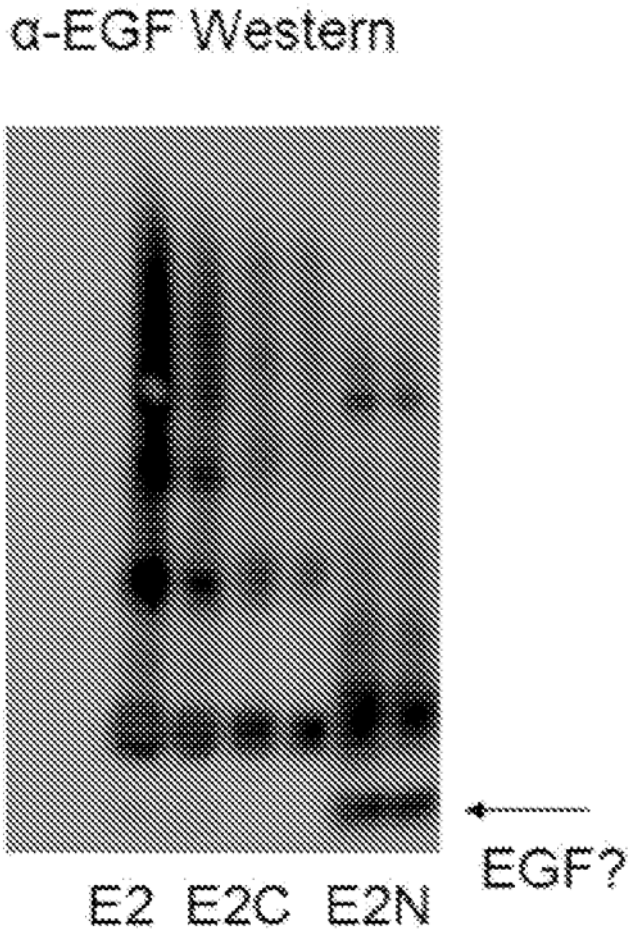


FIG. 21

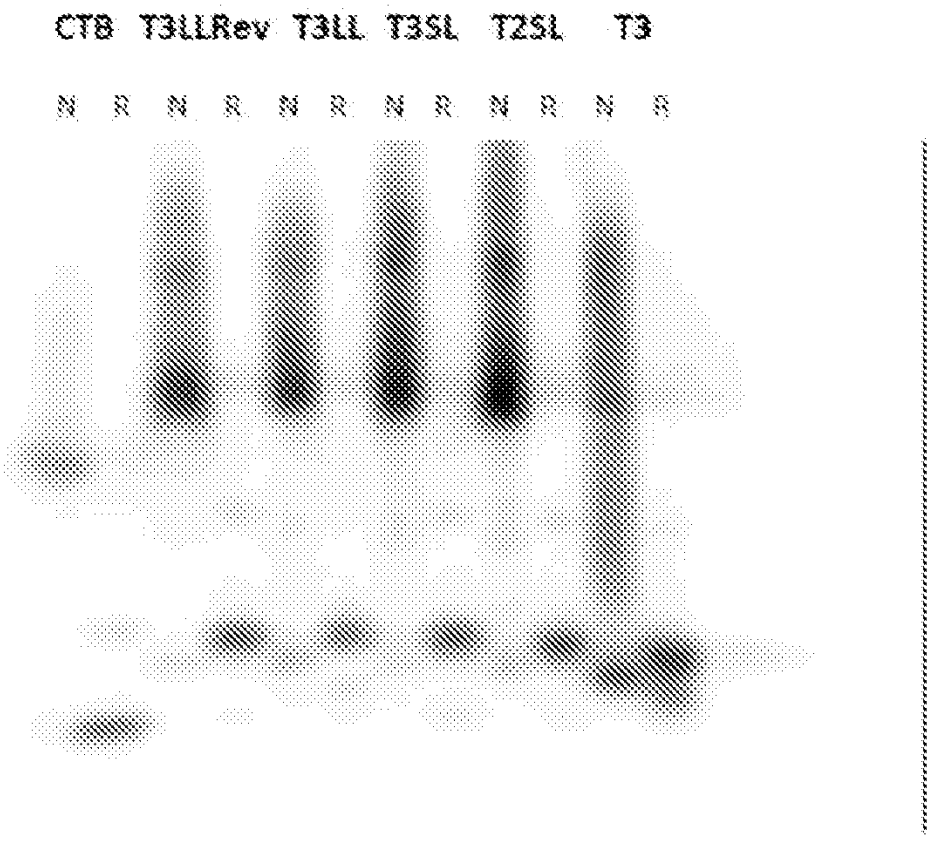


FIG. 22

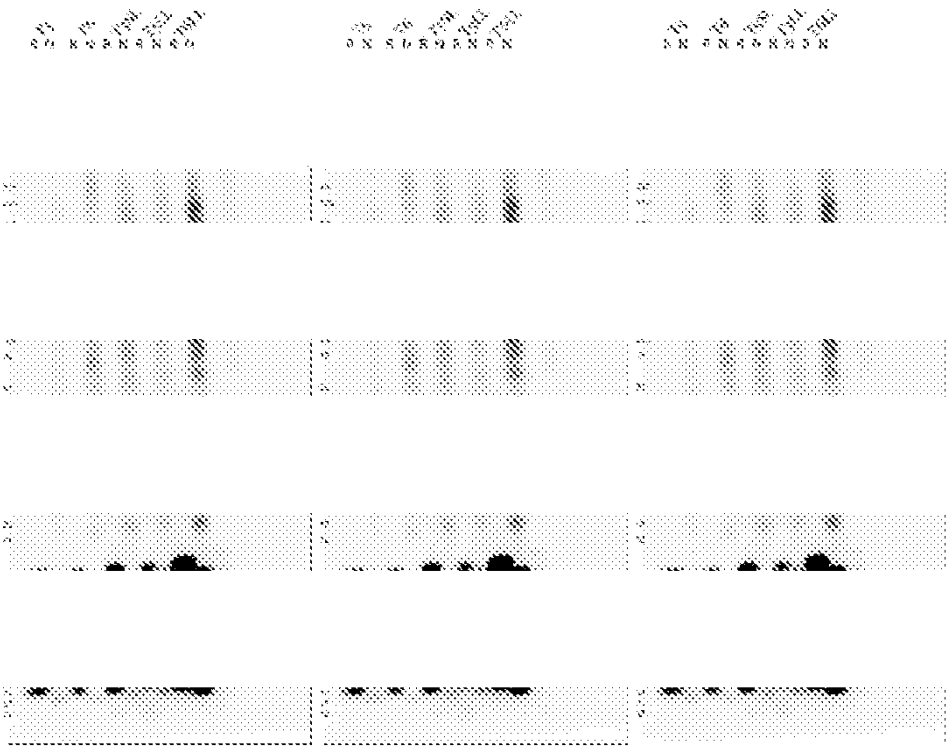


FIG. 23

HHHHHHIEGRGPETLCGAELVDALQFVCGDRGF
YFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMY
CAPLKPAKSAGSSG*NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIE*
*ALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR*GGSGGTSG
GGGGSG*TPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAG*
KREMAIITFKNGATFQVEVPSQHIDSQKKAIERMKDTLR
IAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN

FIG. 24

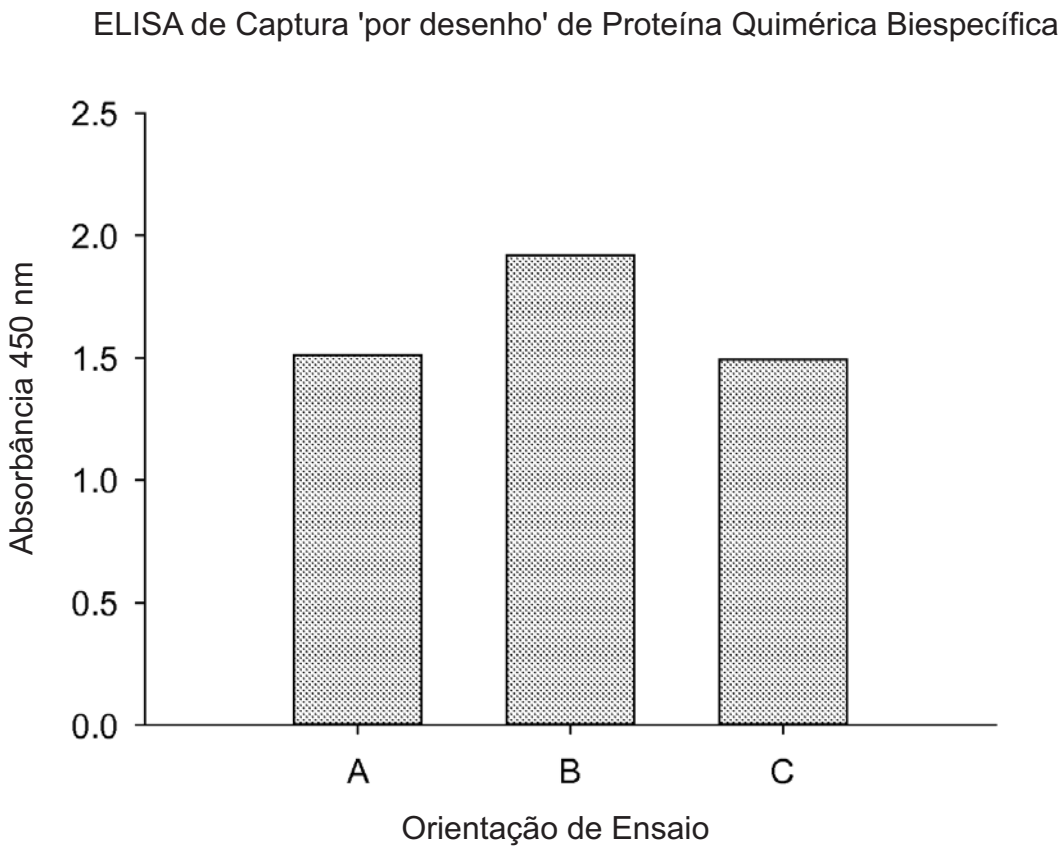

ELISA de Captura 'por desenho' de Proteína Quimérica Biespecífica
Absorbância 450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
A
B
C
Orientação de Ensaio

FIG. 25

H H H H H H I E G R *T P Q N I T D L C A E Y H N T Q I H T L N D K I F S Y T E*
S L A G K R E M A I I T F K N G A T F Q V E V P S Q H I D S Q K K A I E R M K
D T L R I A Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A I A A I S M A N S S G G P
E T L C G A E L V D A L Q F V C G D R G F Y F N K P T G Y G S S S R R A P
Q T G I V D E C C F R S C D L R R L E M Y C A P L K P A K S A

FIG. 26

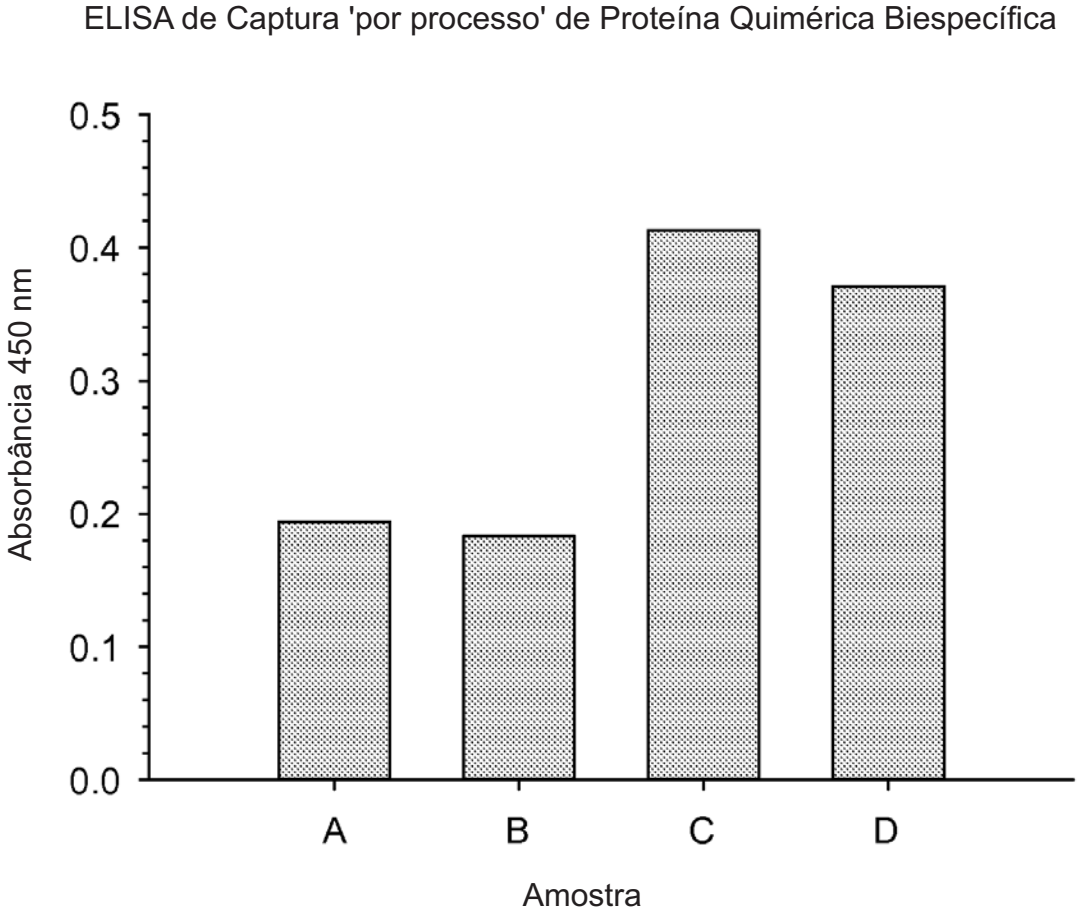

ELISA de Captura 'por processo' de Proteína Quimérica Biespecífica
Absorbância 450 nm
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
A
B
C
D
Amostra

FIG 27

a) mTGF-Beta1

H H H H H H I E G R *T P Q N I T D L C A E Y H N T Q I H T L N D K I F S Y T E S L A G K R E M A I I T F K N G A T F Q V E V P G S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I A Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A I A A I S M A N* S S G A L D T N Y C F S S T E K N C C V R Q L Y I D F R K D L G W K W I H E P K G Y H A N F C L G P C P Y I W S L D T Q Y S K V L A L Y N Q H N P G A S A S P C C V P Q A L E P L P I V Y Y V G R K P K V E Q L S N M I V R S C K C S

b) mFGF2

H H H H H H I E G R *T P Q N I T D L C A E Y H N T Q I H T L N D K I F S Y T E S L A G K R E M A I I T F K N G A T F Q V E V P G S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I A Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A I A A I S M A N* S S G P A L P E D G G A A F P P G H F K D P K R L Y C K N G G F F L R I H P D G R V D G V R E K S D P H V K L Q L Q A E E R G V V S I K G V C A N R Y L A M K E D G R L L A S K C V T E E C F F F E R L E S N N Y N T Y R S R K Y S S W Y V A L K R T G Q Y K L G S K T G P G Q K A I L F L P M S A K S

c) mHGF

H H H H H H Q K K R R N T L H E F K K S A K T T L T K E D P L L K I K T K K V N S A D E C A N R C I R N R G F T F T C K A F V F D K S R K R C Y W Y P F N S M S S G V K K G F G H E F D L Y E N K D Y I R N C I I G K G G S Y K G T V S I T K S G I K C Q P W N S M I P H E H S F L P S S Y R G K D L Q E N Y C R N P R G E E G G P W C F T S N P E V R Y E V C D I P Q C S G G S G G T S G G G G S G G *T P Q N I T D L C A E Y H N T Q I H T L N D K I F S Y T E S L A G K R E M A I I T F K N G A T F Q V E V P G S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I A Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A I A A I S M A N*

d) mIGF-1/2

FIG. 28

d)

HHHHHHIEGR*TPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF*
SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA
IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN
SSGGPETLCGAELVDALQFVCGPRGFYFNKPTGYGSS
IRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMY_CAPLKPTKAA
GGSAYGPGETLCGGELVDTLQFVCSDRGFYFSRPSSR
ANRRSRGIVEECCFRSCDLA_LLETYCATPAKSE

e) mVEGF-A/C

HHHHHHIEGR*TPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF*
SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA
IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMA
*N*SSGVIKFMDVYQRSYCRPIETLVDIFQEYPDEIEYIFK
PSCVPLMRCAGCCNDEALECVPTSESNITMQIMRIKP
HQSQHIGEMSFLQHSRCECRPKK*TEILKSIDNEWRKTQ*
CMPREVCIDVGKEFGAATNTFFKPPCVSVYRCGGCCNS
EGLQCMNTSTGYLSKTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHT
SCRCMS

FIG. 28 (Continuação)

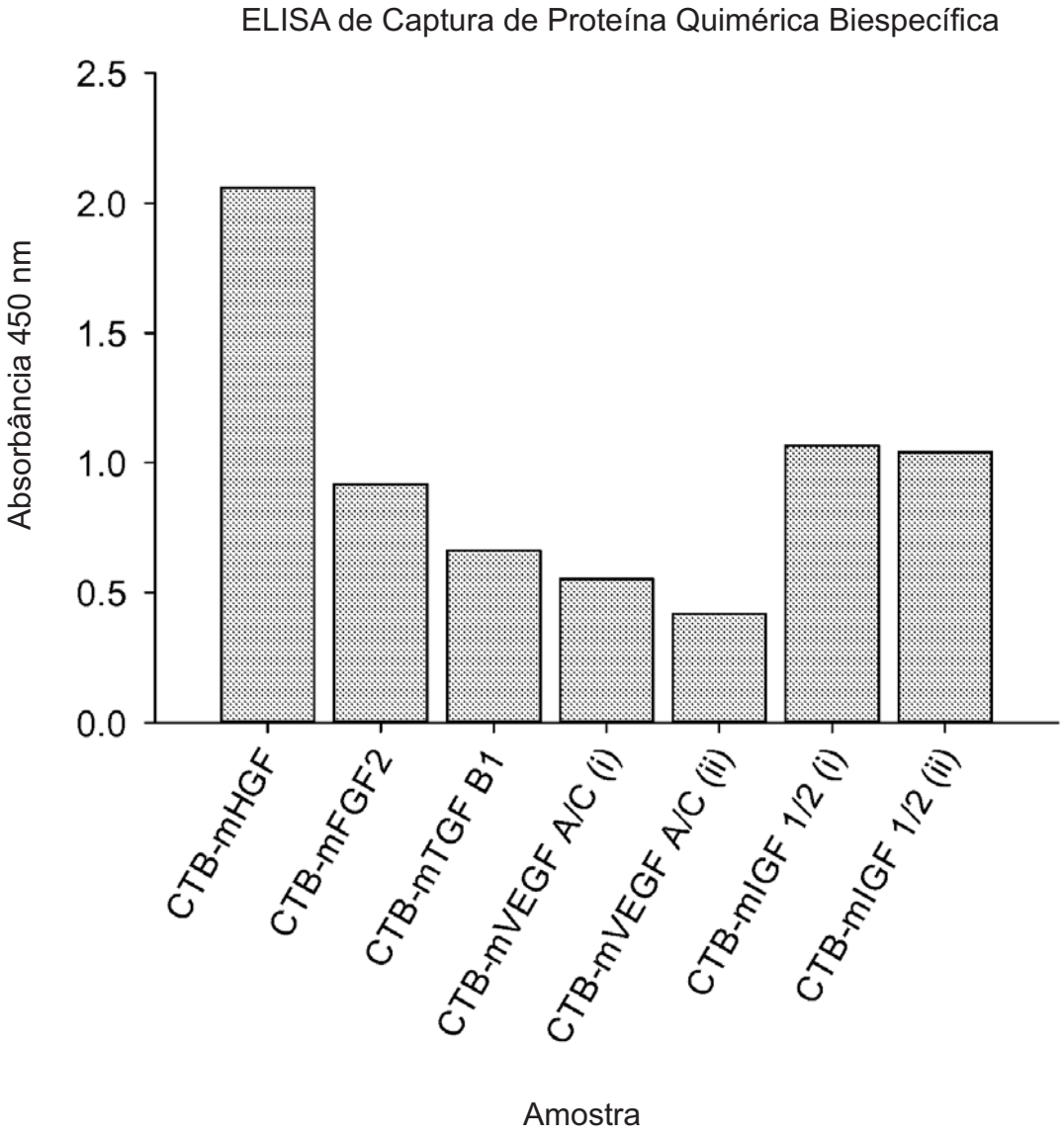

ELISA de Captura de Proteína Quimérica Biespecífica
Absorbância 450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CTB-mHGF
CTB-mFGF2
CTB-mTGF B1
CTB-mVEGF A/C (i)
CTB-mVEGF A/C (ii)
CTB-mIGF 1/2 (i)
CTB-mIGF 1/2 (ii)
Amostra

FIG 29

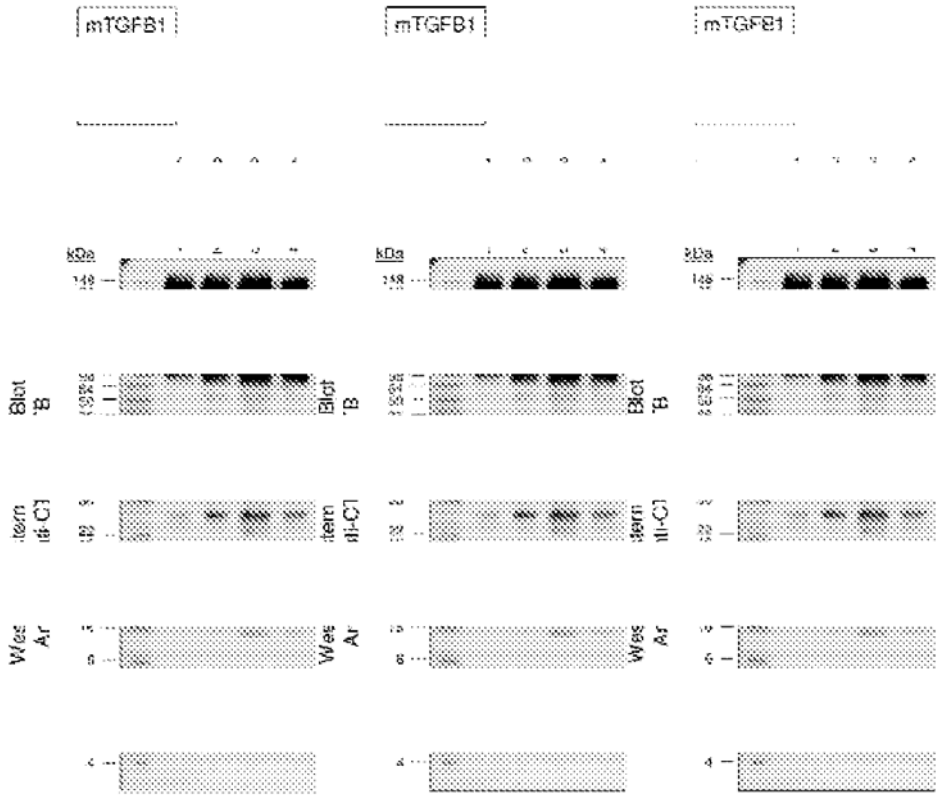


FIG 30

a) HuTGF-Beta1

H H H H H H A L D T N Y C F S S T E K N C C V R Q L Y I D F R K D L G W K W I H E P K G Y H A N F C L G P C P Y I W S L D T Q Y S K V L A L Y N Q H N P G A S A A P C C V P Q A L E P L P I V Y Y V G R K P K V E Q L S N M I V R S C K C S G G S G G T S G G G G G S G *T P Q N I T D L C A E Y H N T Q I H T L N D K I F S Y T E S L A G K R E M A I I T F K N G A T F Q V E V P S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I A Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A I A A I S M A N*

b) Hu-TGF-Beta-R2

H H H H H H I E G R A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E G G S G G T S G G G G G S G *T P Q N I T D L C A E Y H N T Q I H T L N D K I F S Y T E S L A G K R E M A I I T F K N G A T F Q V E V P S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I A Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A I A A I S M A N*

FIG 31

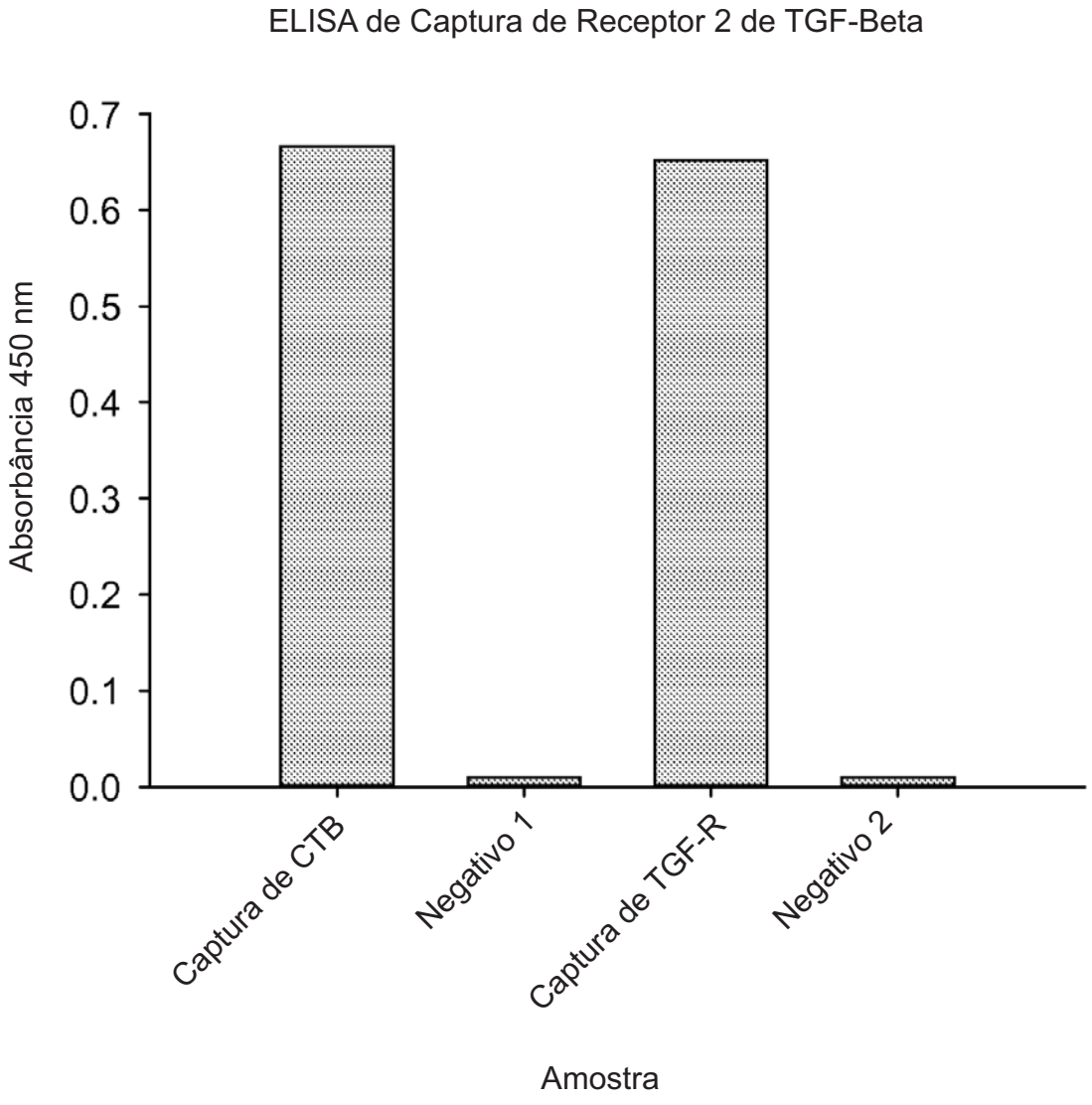

ELISA de Captura de Receptor 2 de TGF-Beta
Absorbância 450 nm
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Captura de CTB
Negativo 1
Captura de TGF-R
Negativo 2
Amostra

FIG 32

Ligação da sequência de HuTGF-Beta à
sequência de receptor 2 de TGF-Beta

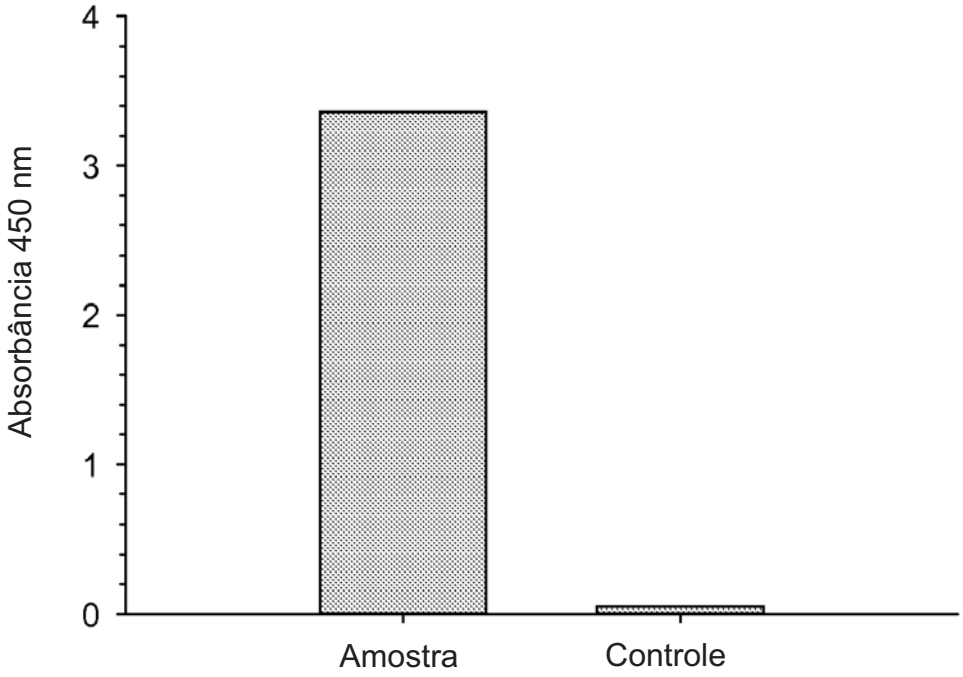


FIG. 33

Ligação dos soros do Grupo 1 a uma diluição de 1/100 a rhIGF

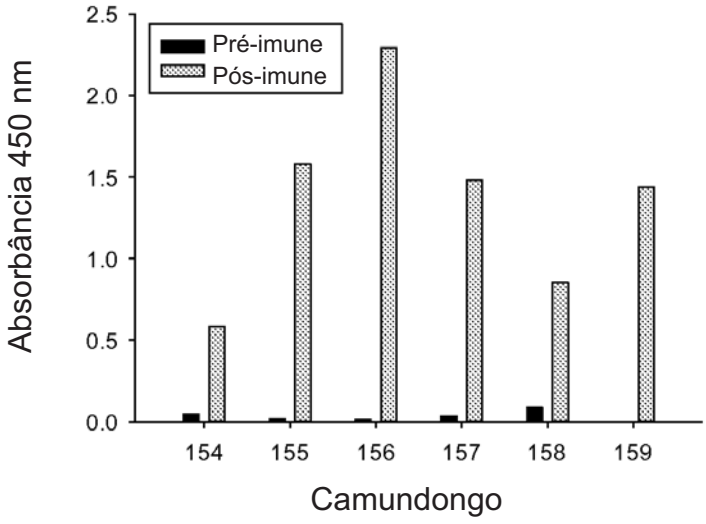


FIG. 34

Ligação dos soros do Grupo 2 a uma diluição de 1/100 a rhEGF

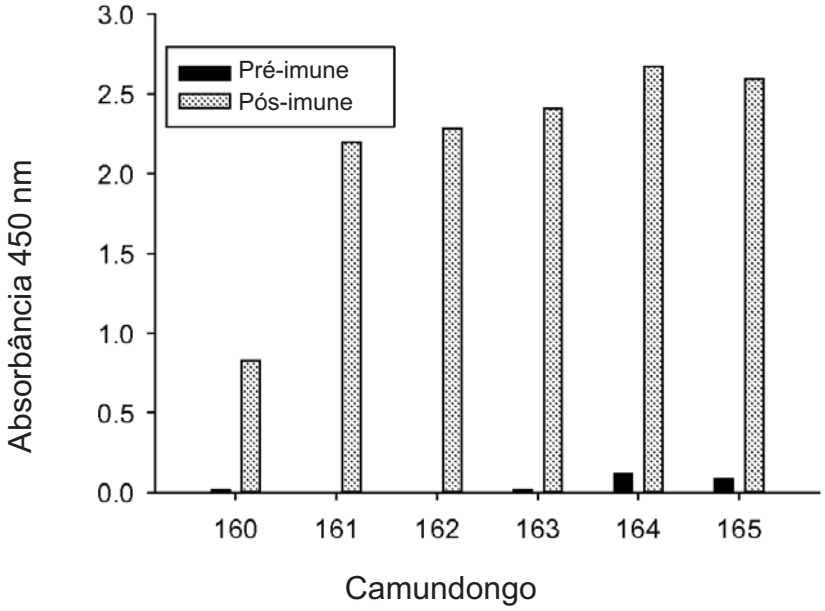
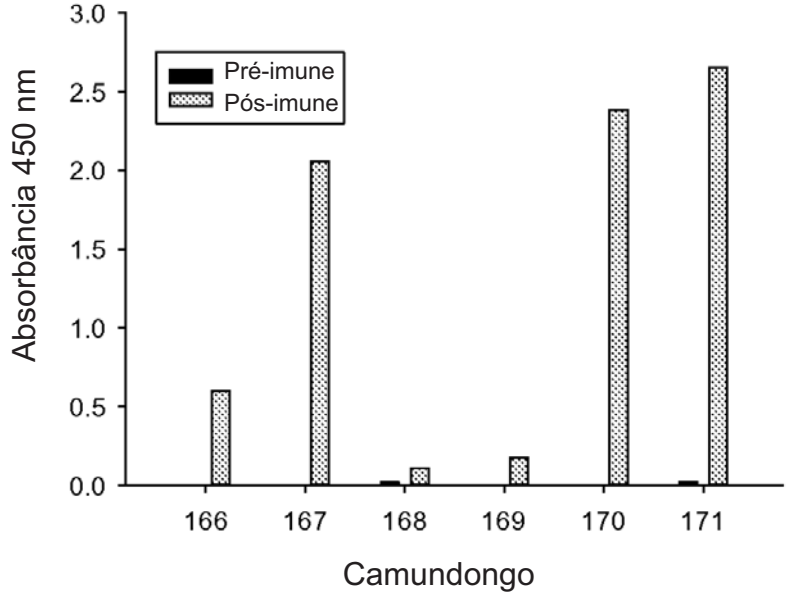


FIG. 35

a)

Ligação dos soros do Grupo 3 a uma diluição de 1/100 a rHu-EGF



b)

Ligação dos soros do Grupo 3 a uma diluição de 1/8 a rHu-EGF

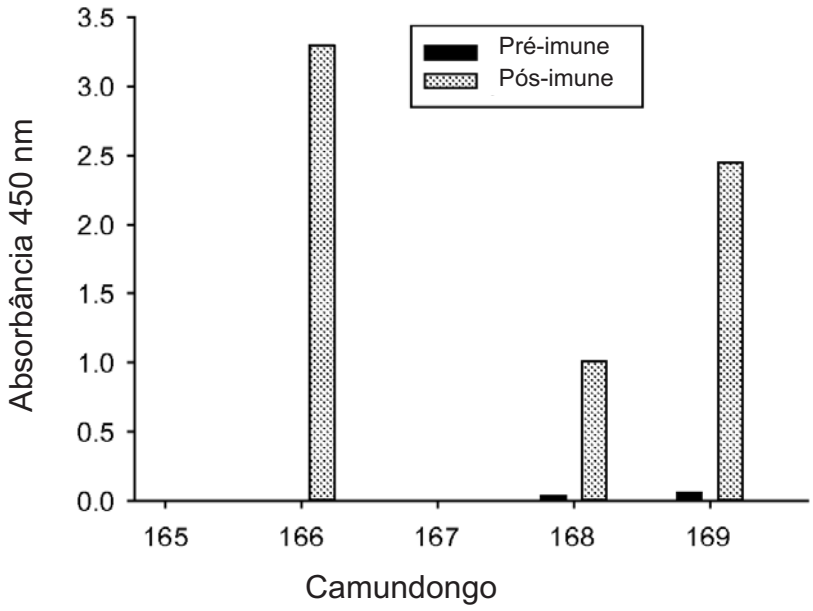
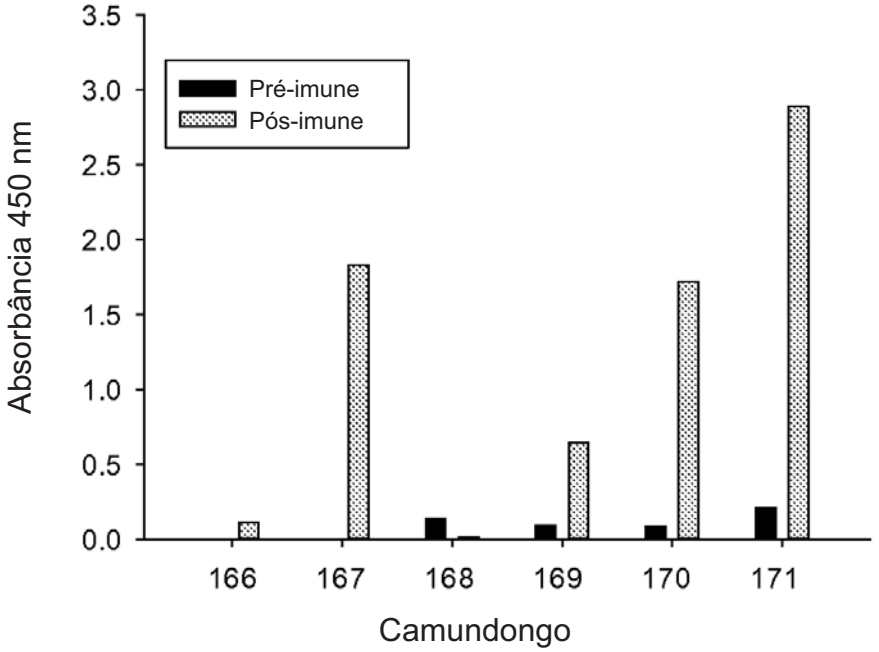


FIG. 36

a)

Ligação dos soros do Grupo 3 a uma diluição de 1/100 a rHu-IGF



b)

Ligação dos soros do Grupo 3 a uma diluição de 1/8 a rHu-IGF

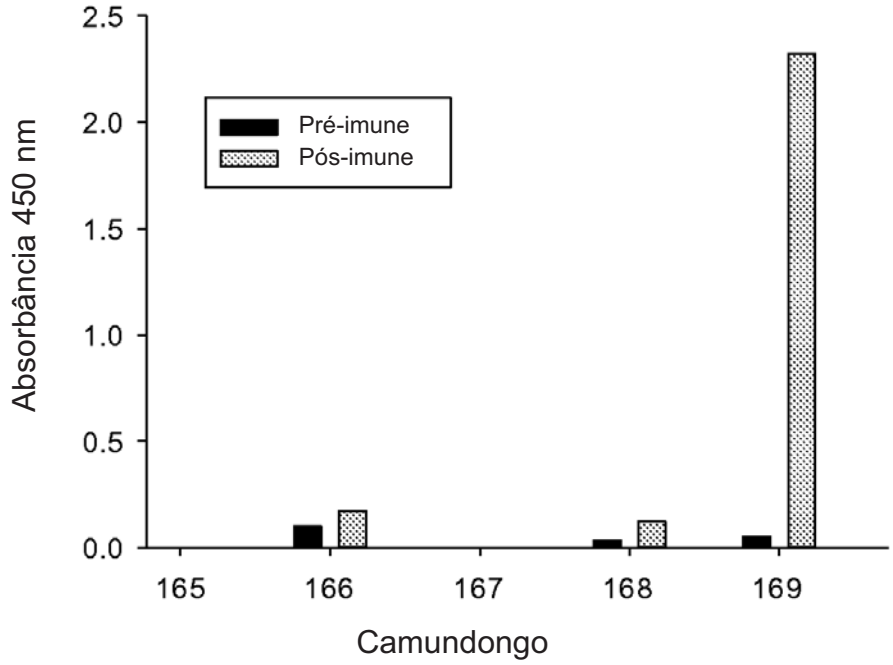
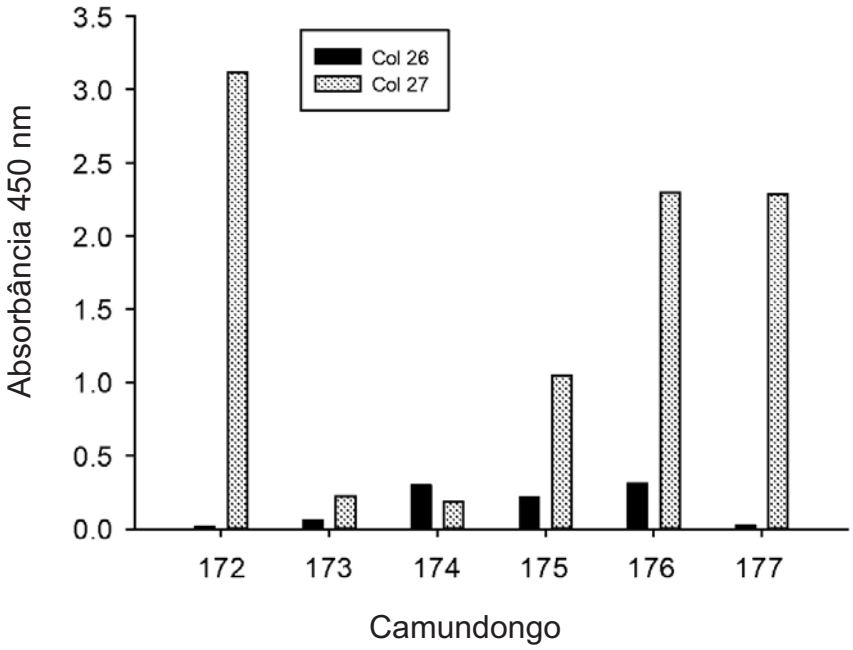


FIG. 37

a)

Ligação dos soros do Grupo 4 a uma diluição de 1/100 a rHu-EGF



b)

Ligação dos soros do Grupo 4 a uma diluição de 1/8 a rHu-EGF

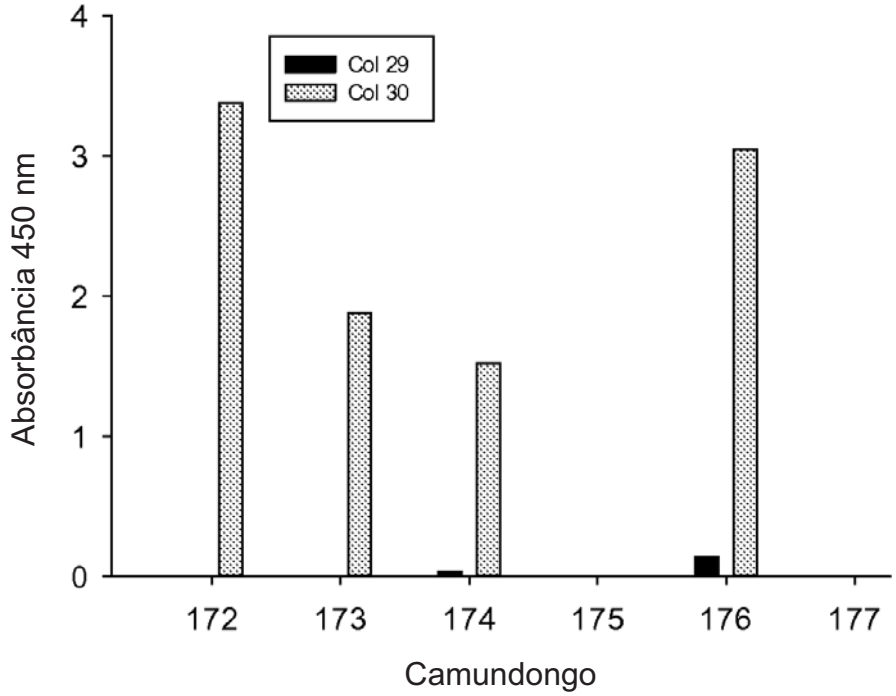
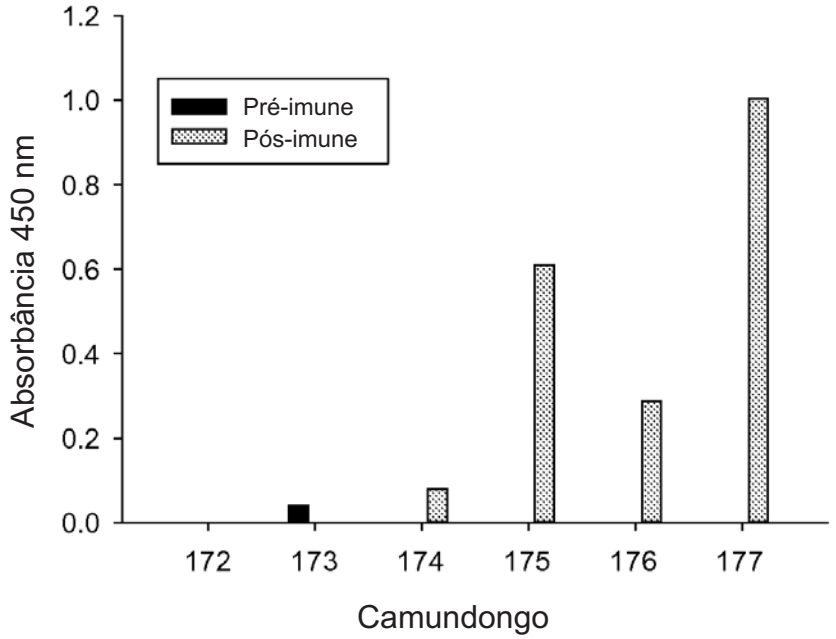


FIG. 38

a)

Ligação dos soros do Grupo 4 a uma diluição de 1/100 a rHu-IGF



b)

Ligação dos soros do Grupo 4 a uma diluição de 1/8 a rHu-IGF

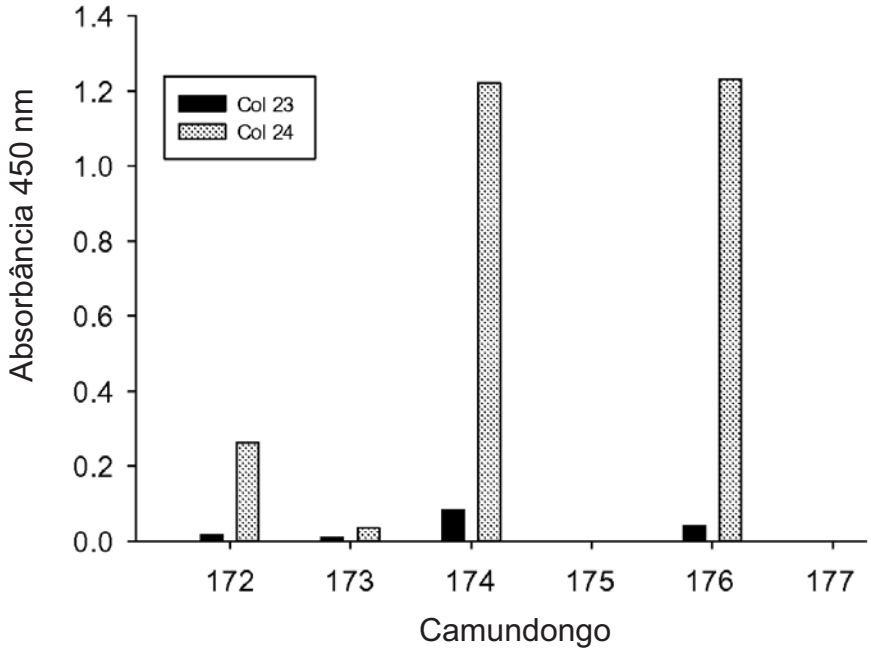


FIG. 39

Ligação dos soros do Grupo 5 a uma diluição de 1/100 a rHu-IGF

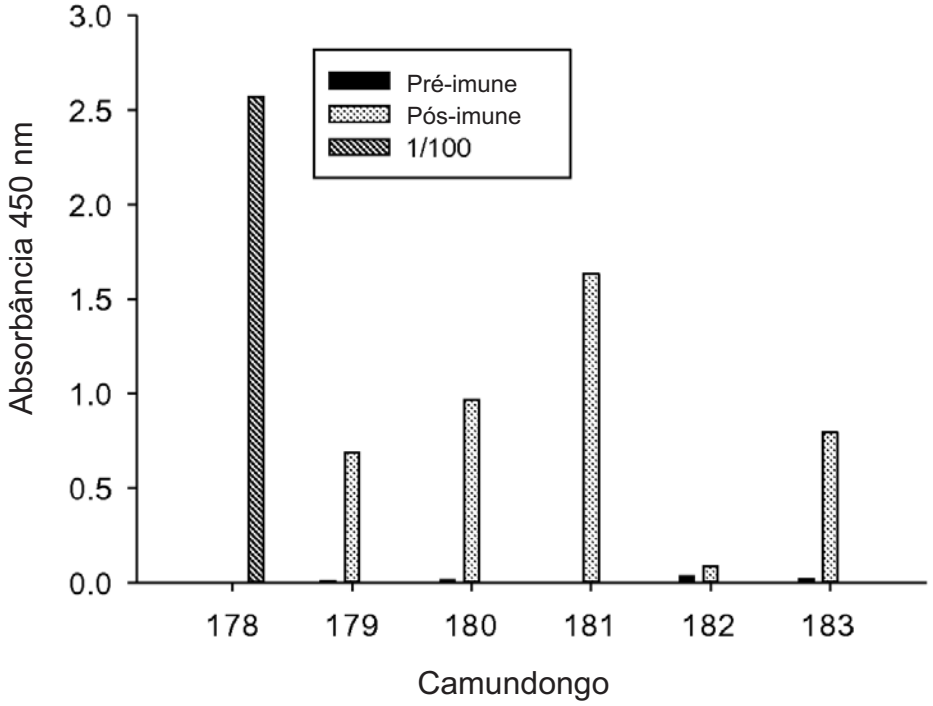
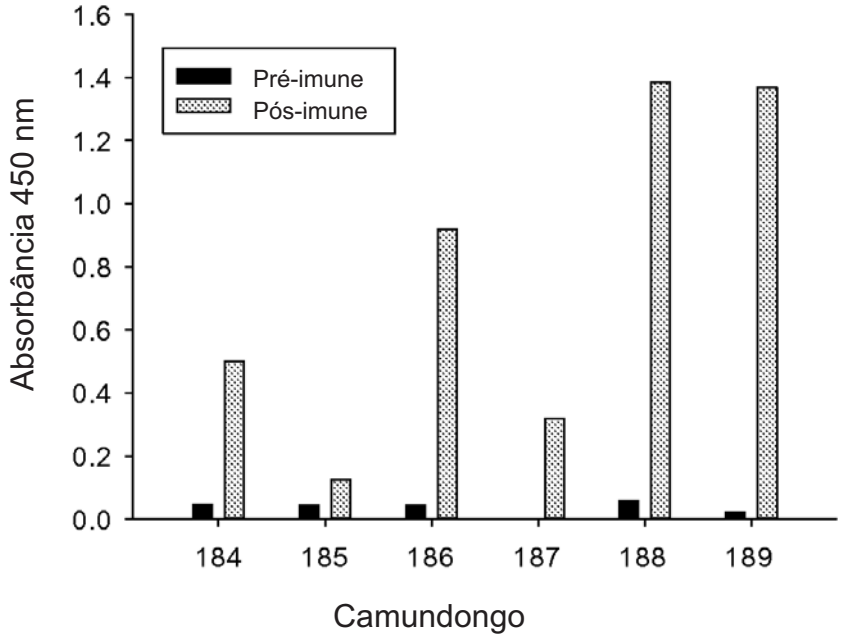


FIG. 40

a)

Ligação dos soros do Grupo 4 a uma diluição de 1/100 a rHu-IGF



b)

Ligação dos soros do Grupo 4 a uma diluição de 1/8 a rHu-IGF

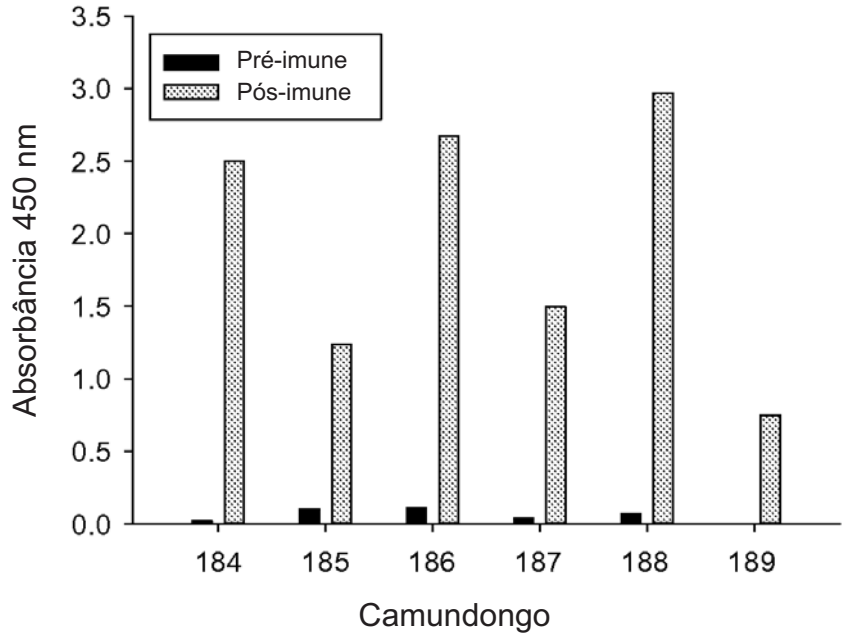


FIG. 41

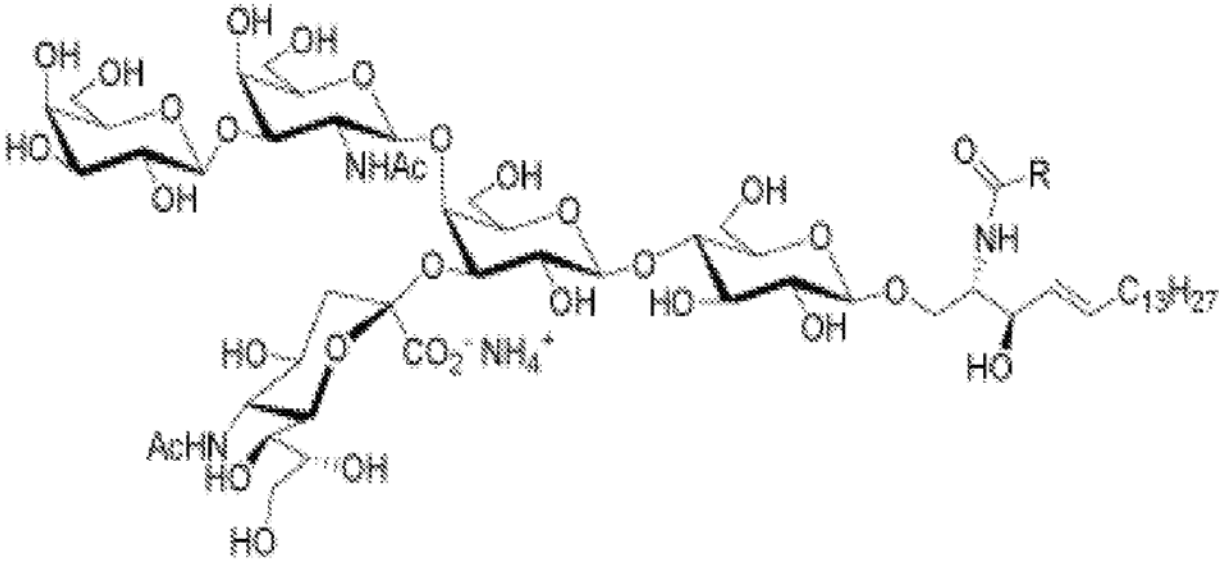

OH
OH
OH
OH
HO
O
O
O
NHAc
O
OH
O
OH
O
O
O
HO
OH
O
O
R
NH
C13H27
HO
HO
O
CO2- NH4+
AcHN
HO
OH
HO

FIG. 42



FIG. 43

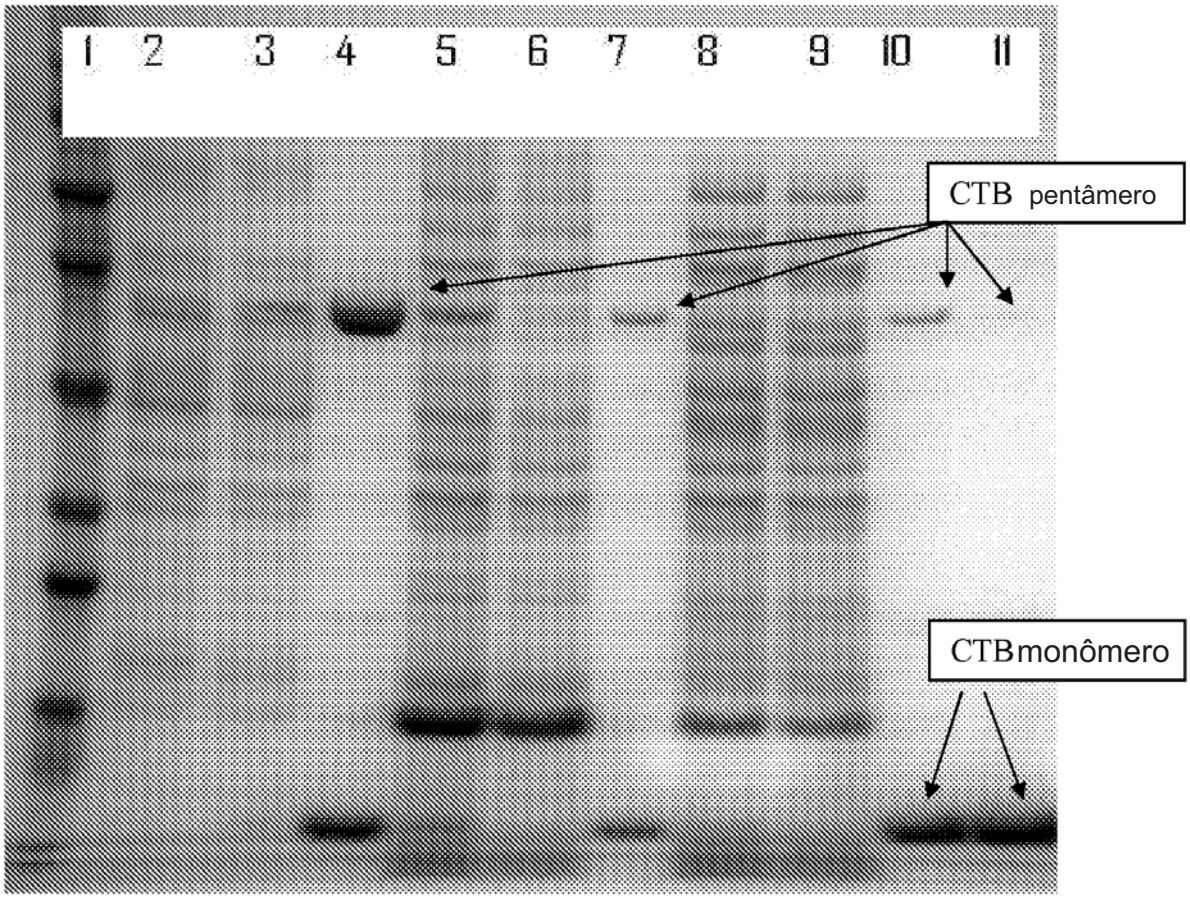


FIG. 44