



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

(11) BR 112015010145-3 B1



(22) Data do Depósito: 30/10/2013

(45) Data de Concessão: 07/06/2022

(54) Título: POLIPEPTÍDEO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

(51) Int.Cl.: A61K 38/18.

(30) Prioridade Unionista: 09/11/2012 CU CU/P/2012/0158.

(73) Titular(es): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR.

(72) Inventor(es): ÁNGEL DE JESÚS CORRIA OSORIO; KALET LEÓN MONZÓN; TANIA CARMENATE PORTILLA; AMAURY PUPO MERIÑO; SAUMEL PÉREZ RODRÍGUEZ.

(86) Pedido PCT: PCT CU2013000007 de 30/10/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/071894 de 15/05/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 05/05/2015

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEO, USO DO MESMO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER. A invenção refere-se às ramificações de biotecnologia e, em particular, aos polipeptídeos mutados de molécula TGF(Beta) cuja sequência primária é altamente homóloga com a sequência de TGF(Beta) humano. Estas muteínas perdem a sua capacidade de interagir com ALK5, mas retêm a sua capacidade de interagir com o resto dos receptores que formam parte do complexo receptor (T(Beta)RII e T(Beta)RIII). Além disso, elas podem antagonizar a sinalização de todas as variantes naturais dos ligantes TGF (Beta), dependente do recrutamento de ALK5 no complexo receptor, e elas têm um efeito imunomodulador. A invenção também se refere a composições farmacêuticas compreendendo, como princípio ativo, os polipeptídeos ou proteínas de fusão descritos e ao uso terapêutico dos polipeptídeos, proteínas de fusão e composições farmacêuticas descritos devido ao seu efeito imunomodulador sobre doenças como o câncer, doenças associadas com fibrose e doenças infecciosas crônicas.

POLIPEPTÍDEO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

ESCOPO DA TÉCNICA

[001] A presente invenção refere-se aos campos da biotecnologia e medicina. Particularmente variantes mutadas de molécula TGF β , que são antagonistas da sinalização de suas contrapartes, e à aplicação terapêutica destas variantes.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] As citocinas TGF β foram descobertas pela sua capacidade para estimular a formação de colônias celulares (Roberts AB, et al, Proc Natl Acad Sci USA 78: 5339-43, 1981); porque este processo é um marcador clássico de transformação celular, esta molécula foi chamada fator de crescimento transformante beta. Atualmente, os ligantes TGF β (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3) são reconhecidos como o protótipo de fatores de crescimento multifuncionais. Quase qualquer tipo de célula no corpo produz os mesmos e expressa seu complexo receptor. Estas moléculas são inibidores potentes da proliferação de células epiteliais, endoteliais e hematopoiéticas (Ravitz, MJ et al, Adv Cancer Res 71: 165-207, 1997) e elas são um dos reguladores mais potentes da produção e deposição de matriz extracelular (Massague, J. The Annu Rev Cell Biol 6: 597-641, 1990) e de cascata de reparação de tecido (Roberts AB., e outros, 275-308 Plenum, 1996). Eles também regulam vários mecanismos durante desenvolvimento embrionário, como a diferenciação celular, migração e angiogênese. (Taya, Y. et al, Development 126: 3869-79, 1999; Lidral, A. et al Am J Hum Genet 63: 557-68, 1998)

[003] No sistema imune, a sinalização de TGF β é um modo de regulação muito importante. Uma de suas funções mais importantes é a manutenção da homeostase de linfócitos e tolerância imune, através da inibição da proliferação de células T nativas induzida por autoantígenos em ambientes linfopênicos. (Bevan, M. et al, Nat Immunol. 27, 13 (7): 667-73,

2012). Esta molécula também suprime ou altera a ativação, maturação e diferenciação de células assassinas naturais (Laouar, Y. et al *Nature Immunol* 6: 600-607, 2005), células dendríticas (Luo, X. et al, *Proc. Natl Acad. Sci USA* 104: 2821-2826, 2007; Bekeredjian Ding, I. et al, *Immunology* 128: 439-450, 2009), macrófagos (Sica, A. et al, *Semin. Cancer Biol* 18, 349 - 355, 2008, Torroella. M et al, *Cancer Res* 69: 4800-09, 2009), neutrófilos (Fridlender, ZG et al, *Cancer cell* 16: 183-194, 2009) e células T efectoras e de memória (Gorelik, L. & Flavell, RA *Nature Med*, 7: 1118-1122, 2001; Flavell, RA *Immunity* 31:131-44, 2009). O TGF β desempenha um papel essencial na indução, diferenciação e manutenção de células T naturais e regulatórias induzidas (CD4+Foxp3+) e células T efectoras TCD4+IL17+ (TH17) (Kryczek, I. et al, *J. Immunol.* 178: 6730-33, 2007; Moo-Young, TA et al. *J. Immunother* 32: 12-21, 2009; Fantini, MC et al *J. Immunol.* 172: 5149-53, 2004; Flavell, R.A. *Cell* 134: 392-404, 2008).

[004] Ligantes de TGF β maduros são homodímeros de 112 resíduos de aminoácidos. Eles são derivados de uma molécula precursora formada pela pró-peptídeo associado em latência (LAP) localizado no N-terminal e o domínio ativo em direção ao extremo C-término. Ambos os domínios são intracelularmente separados por proteólise e os ligantes são secretados como precursores inativos, formados pelo pró-domínio reversivelmente ligado ao domínio ativo, regulando, assim, o acesso aos receptores celulares (Geoffrey D. Young e Joanne E. Murphy-Ullrich. *JBC* Vol 279, No. 36: 38032-39, 2004). Tem sido postulado que o pró-peptídeo associado à latência é também importante para a secreção do domínio maduro (Gray A. e A Mason *Science* 247:1328-30, 1990).

[005] Todas as três isoformas (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3) interagem na membrana plasmática com receptores T β RI, T β RII e T β RIII. Estes últimos, também conhecidos como betaglicano, não são expressados em todos os tipos de células, e embora sejam dispensáveis para a sinalização mediada

por ligantes TGF β 1 e TGF β 3, eles constituem um reservatório destes ligantes quando T β RII está saturado. (Wang XF et al, Cell 67: 797-805, 1991; Lebrin F. et al Cardiovasc. Res 65: 599-608, 2005). T β RIII forma complexos com receptores T β RI e T β RII apresentando o ligante para os mesmos. Estes receptores ligam principalmente a T β RII e o complexo T β RII/TGF β recruta e ativa cooperativamente com o receptor T β RI de alta afinidade, resultando na formação de um complexo heterotrimérico de sinalização. TGF β 1 e TGF β 3 podem ligar a T β RII com alta afinidade (5-30pm), enquanto TGF- β 2 só pode ligar da mesma forma na presença de T β RIII (De Crescenzo et al, J Biol Chem 279: 26013-18, 2004; De Crescenzo et al, J. Mol. Biol 328: 1173-1183, 2003; Groppe et al, Molecular Cell 29, 157-168, 2008).

[006] Até agora, não foi reportado que os ligantes de famílias TGF β 1, TGFB2 e TGF β 3 têm a capacidade de se ligar a outros receptores de tipo II, que fazem parte da mesma família de proteínas à qual T β RII pertence (Huang F e YG Chen Cell Biosc Mar 15, 2: 9, 2012). No entanto, eles podem se ligar com vários receptores de tipo I. ALK5 é descrito como o receptor T β RI de referência de subfamília de seu ligante. Após seu recrutamento para o complexo TGF- β /T β RII, a fosforilação de proteínas SMAD2/3 é induzida (Huang F e YG Chen Cell Biosc; Mar 15; 2:9, 2012). ALK1 é ativado em resposta à formação do complexo TGF/T β RII em células endoteliais e sinaliza por SMAD1 e SMAD5 (Goumans MJ et al, Mol Cell 12 (4): 817-28, 2003). Em algumas células epiteliais, a sinalização de SMAD1/5 é induzida pelo receptor ALK2, ALK3 e ALK6 (Daly AC et al, Mol Cell Biol, 28: 6889-6902, 2008). ALK2 também está associado com os processos relacionados com o desenvolvimento cardiovascular *in vivo* (Olivey HE et al, Dev Dyn 235 (1): 50-9, 2006). Os requerentes desejam destacar que tanto T β RII como ALK5 são singulares para a família de ligantes TGF β 1, TGFB2 e TGF β 3 enquanto ALK1/2/6/3 são mais promíscuos e também compartilhados por Ativinas e Proteínas Morfogenéticas Ósseas (Sebald W. et al, Biol Chem, 385

(8): 697-710, 2004).

[007] A sinalização mediada por ALK5 está associada com vários mecanismos patogênicos em determinadas doenças. No câncer, por exemplo, o seu papel é complexo e está associado com a supressão de resposta imune e promoção da progressão de tumor. A supressão de resposta imune ocorre principalmente durante os primeiros estágios de tumorigênese. Enquanto o seu papel como promotor de tumor ocorre em estágios avançados da carcinogênese, através da indução de fenótipos invasivos metastáticos e a supressão de resposta imune antitumoral (Miyazono K. Nat Rev. Cancer 10: 415-24, 2010; Miyazono K. Cancer Sci 101 (2): 306-12, 2010; Hawinkels LJ. et al, Growth Factors 29(4):140-52, 2011). Outras doenças em que a atividade de TGF β também é prejudicial são as infecções crônicas causadas por patógenos, como o HIV, HBV, HCV, CMV, micobactérias e parasitas *Trypanosoma cruzi*. O TGF β exerce uma influência negativa sobre a resposta imune protetora, permitindo o crescimento e a sobrevivência destes patógenos intracelulares (Reed GS. Microbes and Infection 1: 1313-1325, 1999). Em muitas doenças a superprodução de TGF β contribui para o excesso patológico de tecido fibroso, o que compromete a função normal do órgão danificado. Alguns exemplos de excesso patológico dos tecidos fibróticos são fibrose pulmonar, sarcoidose, fibrose cardíaca, cardiomiopatia, cirrose de fígado, esclerose sistêmica, esclerose glomerular e cirrose biliar primária, entre outros (Kopp JB et al, Microbes and Infection, 1: 1349 - 1365, 1999).

[008] Várias estratégias foram concebidas para inibir a sinalização de TGF β . A maioria dos inibidores foi avaliada em modelos pré-clínicos, embora alguns já terem começado a ser testados em vários tipos de câncer e fibrose em testes clínicos (Flavell RA. Nat Rev Immunol. 10(8): 554-67, 2010; Connolly EC et al, Int J Biol Sci 8(7): 964-78, 2012; Hawinkels LJ. et al, Growth Factors 29 (4): 140-52, 2011). No estado da técnica, podem ser encontradas as seguintes estratégias de inibição:

1- **Neutralização dos ligantes** usando formas solúveis de domínios extracelulares de seus receptores (US 2002/0004037 e US 2007/0244042), anticorpos anti-TGF β (US 2002/076858, US 2005/0276802) ou oligonucleotídeos que bloqueiam a transdução de genes citocinas (US 2004/0006036 US2007/0155685).

2- **Bloqueio de sinalização** usando pequenas moléculas que se ligam ao domínio cinase de T β RI/ALK5 (US 2006/0057145, US 2005/0136043, US 2006/0234911)

3- **Bloqueio de receptor II** com anticorpos que reconhecem o seu domínio extracelular (US 2010/0119516, US 2009/7579186).

[009] Até agora uma estratégia de inibição usando muteínas de ligantes TGF β como antagonistas de sinalização não foi relatada.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0010] A presente invenção está relacionada com a descoberta científica de que variantes mutadas da família TGF β (TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3) podem inibir a função de suas contrapartes naturais. Os inventores constataram pela primeira vez em experiências *in vitro*, que as variantes mutadas de TGF β podem inibir substancialmente a sinalização induzida por variantes nativas e, assim, neutralizaram seus efeitos biológicos. Esta descoberta fornece a base para uma nova estratégia para modular a sinalização de TGF β em doenças como o câncer, fibrose ou infecção crônica em que estes ligantes têm atividade deletéria.

[0011] A presente invenção é sobre os polipeptídeos com elevada homologia no nível de sequência primária com o TGF β humano, exceto em algumas posições onde o aminoácido nativo foi mutado para eliminar ou diminuir substancialmente a sua capacidade para sinalizar através do receptor ALK5 de tipo 1. Estas variantes mutadas de TGF β mantêm a sua capacidade de se ligar com elevada afinidade a receptores T β RII e T β RIII, mas não são capazes de sinalizar, porque elas não interagem com o receptor ALK5 de tipo

I, modulando negativamente a sinalização de variantes naturais por competição com as mesmas para ligação com receptores T β RII e T β RIII de afinidade elevada. A invenção também inclui as aplicações terapêuticas destas variantes mutadas, sozinhas ou em combinação com vacinas ou outras modalidades terapêuticas para o tratamento de doenças como câncer, fibrose ou infecções crônicas em que a ação de TGF β , influencia o curso da doença.

[0012] A novidade da presente invenção é que ela proporciona uma nova abordagem terapêutica para modular a sinalização de TGF β e, assim, modular a capacidade invasiva e metastática de vários tumores e a atividade de vários sistemas imunes e células do tecido conectivo, em doenças em que a função de TGF β reduz a resposta imune protetora ou natural ou induzida por vacinação ou induzindo um reparo de tecido excessivo e fibrose. Nenhuma das estratégias de inibição acima mencionadas usa muteínas de ligantes de TGF β como antagonistas de sinalização. Os mutantes de TGF β da presente invenção são virtualmente autoproteínas e, portanto, tem uma baixa imunogenicidade, o que minimiza o risco de respostas de anticorpos contra os mesmos. Sua alta especificidade para o sistema de receptor TGF β reduz as toxicidades inesperadas (comuns em estratégias com base em inibidores de tamanho pequeno). Estas variantes mutadas de TGF β mantêm as afinidades de ligação ao receptor T β RII, pelo menos, como TGF β 1 e TGF β 3 nativos (6-10 pM). Esta afinidade é difícil de alcançar com outras estratégias de inibição de receptor ou de ligante, com anticorpos monoclonais ou outros fármacos. Surpreendentemente, os autores da presente invenção descobriram que estas variantes mutadas de TGF β mantêm a sua capacidade de interagir com o receptor T β RII e T β RIII, o que constitui uma vantagem em relação aos anticorpos antirreceptor de T β RII, porque as muteínas bloqueiam todos os possíveis sítios de ligação de ligantes naturais para a superfície da célula.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0013] A presente invenção refere-se aos polipeptídeos que

antagonizam a atividade mediada pelo receptor ALK5 de ligantes naturais TGF β . Estes polipeptídeos possuem homologia maior do que 90% em relação à sequência de aminoácidos de ligantes naturais TGF β . Os polipeptídeos da presente invenção têm pelo menos uma mutação em sua sequência de aminoácidos primária, em um dos resíduos selecionados dentre o grupo consistindo de Y6, W30, W32, I51, L51, Q67 e L101.

[0014] Em uma modalidade particular da invenção, o resíduo de aminoácido original é mutado por um dos resíduos de aminoácidos selecionados dentre o grupo compreendendo;

para posição 6: A

para posição 30: N, R, K, D, Q, L, S, P, V, I, G, C, T, A, E;

para posição 32: A;

para posição 51: Q, W, Y, A;

para posição 67: H, F, Y, W e

para posição 101: A, E;

Outro objeto da presente invenção são os polipeptídeos em que as mutações foram adicionadas na interface de interação com receptores TGF β RII e/ou TGF β RIII aumentando a sua afinidade para os mesmos.

[0015] Além disso, a presente invenção refere-se às composições farmacêuticas usadas para o tratamento de câncer, doenças associadas com fibrose e doenças infecciosas crônicas que contêm um ou uma mistura dos polipeptídeos descritos na presente invenção e um veículo farmacêuticamente apropriado para a sua administração. Tais polipeptídeos podem ser ligados covalentemente a uma proteína transportadora, que pode ser albumina ou a região Fc de imunoglobulinas humanas. Em outra modalidade da presente invenção, os polipeptídeos podem ser peguilados.

[0016] Finalmente, a presente invenção refere-se ao uso dos polipeptídeos descritos para a fabricação de uma composição farmacêutica, utilizável no tratamento de câncer, doenças associadas com fibrose e doenças

infecciosas crônicas, bem como para aprimorar a resposta celular e/ou humoral às vacinas em substituição de TGF β nativo especialmente quando a vacina a potenciar é uma vacina terapêutica para o tratamento de câncer.

Obtenção de polipeptídeos mutados TGF β

[0017] A presente invenção refere-se aos polipeptídeos com 112 aminoácidos de comprimento. Estes polipeptídeos mantêm uma elevada identidade de sequência com as moléculas TGF β nativas diferentes, mais de 90% de identidade. Em uma zona de sua sequência, os polipeptídeos incluem 1-6 mutações em comparação com o TGF β nativo. Os resíduos que substituem os resíduos originais são selecionados para ter propriedades físico-químicas muito diferentes com relação ao aminoácido original, uma mudança no resíduo de não polar para polar, de carregado para não carregado, de grande para pequeno e de ácido para básico.

[0018] Estes polipeptídeos, que podem também ser chamados muteínas TGF β , foram projetados com base na estrutura tridimensional de TGF β 1, TGFB2 e TGFB3 nativos em complexo com seus receptores T β RII e ALK5 (e entrados na base de dados PDB). Mutações foram introduzidas apenas nas posições de TGF β correspondendo aos aminoácidos significativamente expostos ao solvente que formam parte da região de ligação do receptor ALK5 mas não a do receptor T β RII. Estes resíduos foram previstos como sendo importantes na interação com ALK5 usando programas de bioinformática de domínio público. A tabela a seguir mostra os resíduos da interface de ligação para ALK5 que são previstos como sendo importantes na interação e as mutações possíveis que afetam a ligação. Com estes resultados uma base de dados de todos as possíveis muteínas teóricas foi realizada e as muteínas de maior potência antagonista *in vitro* foram selecionadas

Tabela 1: Aminoácidos na sequência de TGF importante para interação T β RI/ALK5 e mutações que de acordo com a previsão teórica irão desestabilizar a ligação.

| Resíduo TGFβ | Conservação evolutiva | Mutações |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|
| W30 | Conservada idêntica | N,R,K,D,Q,L,S,P,V,I,G,C,T,A,E |
| W32 | Conservada idêntica | A |
| L101 | Conservada idêntica | A,E |
| I51 | Conservada idêntica | Q,W,Y,A |
| Q67 | Não conservada | H, F, Y, W |
| Y6 | Não conservada | A |

[0019] Os polipeptídeos desta invenção podem ser obtidos por vários procedimentos, incluindo a síntese química de proteínas. Eles também podem ser obtidos por técnicas de engenharia genética, tais como expressando os mesmos como corpos de inclusão em bactérias, como *E. coli*, ou em células de mamíferos, como células CHO e HEK293 usando qualquer protocolo de transfecção refletido na técnica da técnica. As mutações em posições específicas também podem ser obtidas por técnicas de mutagênese dirigida, por meio de reação da cadeia de polimerase.

Seleção de polipeptídeos mutantes TGFβ de acordo com a sua atividade biológica;

[0020] Os polipeptídeos da presente invenção são selecionados de experiências *in vitro* e *in vivo* de modo a possuírem simultaneamente as seguintes propriedades:

- Estas variantes mutadas de TGFβ, também referidas como muteínas na presente invenção, mantém a sua capacidade de se ligar ao receptor TβRII. Esta capacidade de ligação pode ser avaliada diretamente por meio de um teste ELISA, comercialmente disponível, para detectar a cadeia do receptor TβRII ou indiretamente sobre populações de células receptoras-positivas. Os níveis de reconhecimento do receptor TβRII devem ser comparáveis aos do TGFβ nativo.

- Estas muteínas bloqueiam a ligação de ligantes TGFβ (TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3) ao receptor TβRII. Isto pode ser medido diretamente por um ELISA competitivo, cobrindo as placas com cada um dos ligantes de TGFβ (comercialmente disponível) e avaliando a capacidade de

muteína para inibir a ligação de T β RII aos ligantes.

- Estas variantes mutadas de TGFB perdem ou reduzem substancialmente a sua capacidade de sinalizar através do receptor T β RI. Esta propriedade pode ser avaliada diretamente através de testes *Western immunoblotting* quantificando os níveis de Smad2 e Smad3 fosforilados em lisados de células de tumor da linhagem 4T1 murino e linhagem humana de células MDA-MB231 tratadas com as muteínas ou com TGF β nativo. Estas muteínas devem induzir a fosforilação de Smad2 e Smad3, pelo menos, 100 vezes menos do que o TGF β nativo. A propriedade de indução de fosforilação também pode ser avaliada *in vitro* em testes de inibição da proliferação induzida por IL-2 em linhagem de células CTLL-2. Estes mutantes devem ter uma atividade inibidora, pelo menos, 100 vezes mais baixa do que a do TGF β nativo.

- Estas variantes mutadas de TGFB são capazes de inibir a sinalização induzida por cada ligante TGFB (TGF β 1, TGFB2, TGFB3). Esta propriedade pode ser avaliada diretamente através de testes *Western immunoblotting* quantificando os níveis de Smad2 e Smad3 fosforilado em lisados celulares de tumor da linhagem murino 4T1 e linhagem humana de células MDA-MB231 tratadas com as muteínas ou com TGFB nativo. Em uma faixa de concentração de 50 ng/mL a 10 μ g/mL, as muteínas devem apresentar uma capacidade para inibir, pelo menos, 100 vezes a sinalização induzida pelos ligantes comerciais.

- Estas variantes mutadas de TGFB têm um efeito antitumoral *in vitro*. Elas podem inibir a migração de diversas linhagens de células tumorais tratadas ou não com o ligante nativo. Exemplos destas linhagens são linhagem murino 4T1 e linhagem humana MDA-MB231. Em testes de migração celular, estas muteínas devem ser capazes de inibir significativamente, de um ponto de vista estatístico, a migração de células tumorais.

- Estas variantes mutadas de TGF β perdem ou substancialmente reduzem a sua capacidade de induzir a diferenciação de células T CD4+ *naive* para fenótipos Treg Foxp3+ ou TH17 na presença de IL-2 ou IL-6 e IL-23, respectivamente. Esta propriedade pode ser avaliada diretamente em testes de indução *in vitro* de células Treg e Th17. Estes mutantes devem ter uma capacidade de indução de pelo menos 100 vezes menor do que se TGF β nativo.

- Estas variantes mutadas TGF β têm a capacidade de inibir a diferenciação de células T CD4+ *naive* para fenótipos Treg Foxp3 + ou TH17 induzidos pelos análogos naturais. Esta propriedade pode ser avaliada diretamente em testes *in vitro* de indução de células Treg e Th17. Em uma faixa de concentração de 50 ng/mL-10 μ g/mL, estas muteínas deverão apresentar a capacidade de inibir, pelo menos, 100 vezes a sinalização induzida por ligantes comerciais.

- Estas variantes mutadas do TGF β têm um efeito antitumoral *in vivo*. Elas podem inibir o crescimento de tumores *in vivo* e a capacidade metastática de várias linhagens de tumor em um modelo de tumor transplantável. Esta propriedade pode ser avaliada usando um modelo de tumor primário ortotópico de linhagem de mama 4T1 em camundongos BALB/c e em linhagem de células de tumor humano MDA-MB231 em camundongos nus. Estas muteínas devem causar uma redução estatisticamente significativa do tamanho do tumor e número de metástases nos pulmões, quando comparadas com o grupo de controle tratado com PBS.

- Estas variantes mutadas de TGF β têm a capacidade de aumentar a resposta imune antitumor natural *in vivo* ou induzida por vacinação em um modelo de tumor transplantável.

[0021] Esta propriedade pode ser avaliada usando um modelo de tumor primário ortotópico de linhagem de mama 4T1 e linhagem de tumor de cólon CT26 subcutâneo, em camundongos BALB/c. Estas muteínas devem

aumentar a atividade citolítica e secreção de citocinas de células assassinas naturais e linfócitos T CD8+. Elas devem também aumentar a atividade de células dendríticas e células T CD4+ padrão Th1 e reduzir significativamente o número de células T regulatórias e células supressoras mieloides e sua atividade pró-tumoral.

[0022] A presente invenção engloba modificações adicionais das muteínas TGF β a partir do que o domínio maduro faltando LAP pode ser produzido, sem afetar a secreção do mesmo. Isto implica que as muteínas podem ser obtidas em sua forma ativa de modo que elas interajam com T β RII, o que resulta na simplificação do processo de produção.

[0023] Em outra modalidade, a presente invenção refere-se a modificações adicionais de muteínas TGF β que aumentam a sua meia-vida. Essas modificações incluem peguilação, a fusão de qualquer um dos polipeptídeos imunomoduladores acima descritos para uma proteína transportadora, que pode ser albumina ou a região Fc de imunoglobulinas humanas, entre outras.

[0024] Em uma modalidade mais particular, a presente invenção refere-se a variantes mutadas de TGF β (mutações específicas são referidas na Tabela 2) fusionadas com um fragmento Fc de uma IgG1 humana, que resulta em uma muteína que foi selecionada para exibir as propriedades acima referidas. A região Fc selecionada para a copulação tem um conjunto de mutações (ala234, ala235) no domínio C γ 2, que impede à mesma interagir com receptores Fc gama, exceto com o receptor Fc neonatal, silenciando deste modo a sua capacidade para induzir mecanismos efetores imunes (Labrijn AF et al, Curr Opin Immunol. Aug, 20 (4):479-85, 2008. Epub 2008 Jul 9).

[0025] Estas muteínas têm múltiplas substituições de aminoácidos que reduzem significativamente a sua capacidade de sinalizar através de ALK5. No entanto, elas mantêm a sua capacidade para se ligar a T β RII e T β RIII, e inibem a atividade de TGF β nativo.

Tabela 2: Mutante construído, referindo-se à mutação de acordo com a numeração de TGF β humano.

| Mutações | Nome de referência |
|-------------------------------------|--------------------|
| W30E, L101E, I51Q | G M1 |
| W30E, L101A, L51Q | G M2 |
| W30E, L101E, I51Q, Q67H | G M3 |
| W30E, L101A, K97D, E12H, I51Q, Q67H | G M4 |

[0026] Em outra modalidade, a presente invenção também engloba modificações adicionais de muteínas TGF β , feitas de modo a aumentar ou a sua afinidade para T β RII e T β RIII, mas sem afetar ou mesmo melhorar o seu caráter inibidor, ou para melhorar a sua farmacodinâmica *in vivo* com o aumento da meia vida. Tais mutações adicionais podem ser obtidas por projeto racional com ferramentas da bioinformática ou usando bibliotecas moleculares combinatórias de natureza diferente (bibliotecas de exibição em fagos, bibliotecas de expressão de genes em leveduras ou bactérias).

Aplicação terapêutica dos polipeptídeos mutantes TGF β .

[0027] Esta invenção também inclui as composições farmacêuticas compreendendo, como princípio ativo, muteínas TGF β e seus análogos ou as proteínas de fusão descritas na presente invenção, bem como as suas possíveis aplicações terapêuticas para a modulação da capacidade invasiva e metastática de vários tumores e a atividade de várias células do sistema imune e tecido conectivo e em doenças em que as funções de TGF β reduzem a resposta imune protetora, seja natural ou induzida por vacinação, ou induzem um reparo de tecido e fibrose excessivo.

[0028] Para o seu uso terapêutico, os polipeptídeos da presente invenção podem ser administrados a um indivíduo sofrendo de uma doença independentemente ou combinado com outros polipeptídeos ou outras substâncias que facilitam ou intensificam a sua ação terapêutica. A via de administração pode ser qualquer uma das vias de administração descritas na técnica da técnica para a administração parenteral de fármacos. Os polipeptídeos podem ser preferivelmente administrados intravenosamente, intramuscularmente, subcutaneamente ou intratumoralmente.

[0029] Os polipeptídeos ou proteínas de fusão descritos na presente invenção também podem ser administrados como parte de uma composição farmacêutica utilizável no tratamento de câncer, doenças associadas com fibrose e doenças infecciosas crônicas. Preferivelmente, a presente invenção engloba composições, incluindo composições farmacêuticas, compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0030] A composição inclui os veículos farmaceuticamente aceitáveis. Os veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a: solução salina, água estéril, solução salina tamponada com fosfato, e similares. Outros agentes de tamponamento, agentes dispersos e substâncias inertes não tóxicas apropriadas para administração a um paciente podem ser incluídos nas composições da presente invenção. As composições podem ser soluções apropriadas para administração e são estéreis e livres de partículas indesejáveis.

[0031] Em outra modalidade, a presente invenção também se refere aos métodos de tratamento compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de polipeptídeos, proteínas de fusão ou composições descritas na presente invenção a indivíduos com câncer, doenças associadas com fibrose ou doenças infecciosas crônicas. Em uma modalidade particular, o indivíduo é um ser humano.

[0032] Os polipeptídeos ou proteínas de fusão descritas na presente invenção também podem ser administrados em combinação com terapias oncológicas tradicionais (quimioterapia e radiação) como um potenciador do efeito das mesmas.

[0033] Para alcançar o efeito terapêutico desejado, os polipeptídeos da presente invenção devem ser administrados em doses elevadas o suficiente para garantir que a sua concentração no linfonodo ou sítio periférico seja apropriada para a doença de interesse, isto é, na faixa de concentração em que a muteína mostra um efeito inibidor de TGF β nativo. A dose deve ser assim

ajustada ao tipo de doença e via de administração a ser estudada. Por exemplo, no caso da terapia de tumores, a dose deve ser ajustada de forma a atingir concentrações de mutantes dentro do tumor e/ou nódulo linfático loco-regional de modo elevado o suficiente para exibir um efeito inibitório. As faixas de dose a serem exploradas podem variar entre 1,25 a 20 mg/kg/dose em prazo semanal ou bissemanal.

[0034] O número de administrações deve também ser ajustado para a biodistribuição da muteína em questão. Em geral, as concentrações eficazes acima mencionadas devem ser mantidas durante um período de tempo na faixa de 2 a 30 dias consecutivos. Se a muteína for copulada a uma proteína transportadora, a frequência da administração deve ser ajustada em conformidade.

[0035] Quando um composto ou uma composição da invenção é usado em combinação com outro agente anticâncer, a presente invenção proporciona, por exemplo, opções de tratamento simultâneos, escalonados ou alternados. Assim, o(s) composto(s) da invenção pode(m) ser administrado(s) simultaneamente em composições farmacêuticas separadas, isto é, um composto da invenção pode ser administrado antes ou após o outro agente anticâncer, por exemplo, com uma diferença de segundos, minutos, horas, dias ou semanas.

[0036] Ação terapêutica é definida como a remissão total ou parcial dos sintomas de uma doença. No câncer, a ação terapêutica é definida como uma diminuição no volume do tumor ou um aumento no tempo de recidiva, entre outros.

[0037] Esta nova estratégia terapêutica apresenta muitas vantagens em relação com outras propostas para modular a sinalização de TGF β . Por exemplo:

- Mutantes de TGF β são virtualmente autoproteínas (exceto por algumas mutações) e, portanto, têm baixa imunogenicidade. Este fato

minimiza o risco de respostas de anticorpos contra os mesmos.

- A sua elevada especificidade pelo sistema de receptor TGF β reduz toxicidades inesperados, que são comuns em estratégias com base em inibidores de pequeno tamanho.

- Estas variantes mutadas de TGF β mantêm a afinidade de ligação ao receptor T β RII, pelo menos, como TGF β 1 e TGF β 3 nativos (6-10 pM). Esta afinidade é difícil de combater com as estratégias de inibição de receptor ou ligante, com anticorpos monoclonais ou outros fármacos.

- Estas variantes mutadas do TGF β têm um tamanho menor do que os anticorpos monoclonais e receptores copulados a Fc. Esta característica assegura uma penetração melhor no tumor do que os outros fármacos que inibem a sinalização de TGF β e descritos acima.

- Estas variantes mutadas de TGF β inibem a sinalização de qualquer ligante através do sistema de receptor T β RII/T β RI (ALK5), o que é uma vantagem teórica sobre os anticorpos pan-ligante, porque são dirigidas apenas para as isoformas de TGF β conhecidas, se existem outras isoformas estes anticorpos poderão não inibir as mesmas.

- Variantes mutadas de TGF β mantêm a capacidade de interagir com o receptor T β RIII. Isto constitui uma vantagem em relação aos anticorpos antirreceptor de T β RII, porque estas muteínas bloqueiam todos os possíveis sítios de ligação de ligantes TGF β naturais para a superfície celular.

- A ligação de um fragmento Fc aumenta a meia-vida de muteínas, que o iria conferir às mesmas uma vantagem com relação aos fármacos de tamanhos pequenos, uma vez que as doses e a sua frequência seriam menores.

- A ligação de um fragmento Fc a uma IgG1 humana que não interage com os receptores Fc gama, exceto com o receptor Fc neonatal, evita disparar mecanismos efetores imunes em células não tumor do hospedeiro, reduzindo o potencial para as toxicidades inesperadas quando comparado com

anticorpos antirreceptor de II que mantêm a sua plena capacidade para interagir com os receptores Fc gama.

[0038] A presente invenção será mais amplamente explicada pelos seguintes exemplos e desenhos. No entanto, estes exemplos não devem ser interpretados como limitando o escopo da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0039] **Figura 1.** Análise de *Western blot* da muteína G_M1 e TGFβ1. Proteínas de fusões Fc tipo selvagem. SDS-PAGE destas proteínas foi realizado sob condições não redutoras e redutoras, e a coloração foi feita com um anticorpo TGFβ1 anti-humano. Primeira trilha carregada com um padrão de proteína de peso molecular baixo, a segunda trilha carregada com muteína GM_1_Fc, terceira com TGFβ1 _Fc tipo selvagem e a quarta com o anticorpo hR3 irrelevante foram usadas.

[0040] **Figura 2.** Teste de ELISA para avaliar o reconhecimento do receptor TβRII pela muteína G_M1_Fc. Como controle negativo foi usado o anticorpo irrelevante hR3. Muteína G_M1 retém uma capacidade de ligação para o receptor TβRII, que é similar à de TGFβ1 nativo.

[0041] **Figura 3.** Teste para avaliar a inibição de proliferação de linhagem de células CTLL-2- dependente de IL-2, induzida por TGFβ mutante ou nativo. Mostra-se que a capacidade da muteína G_M1 para inibir a proliferação da linhagem de células CTLL-2 é muito mais baixa do que a do TGFβ1 humano nativo. Os dados são expressos como a percentagem média de inibição a partir de três experiências independentes.

[0042] **Figura 4.** Teste para avaliar a capacidade de muteína G_M1 para neutralizar a inibição de proliferação de linhagem de células CTLL-2 dependente de IL2, causada por TGF β1 nativo. A figura mostra a porcentagem média de proliferação celular classificada em três experimentos independentes.

[0043] **Figura 5.** Muteína G_M1 inibe *in vitro* a migração de

linhagem de células de tumor 4T1 murino. Imagens de fechamento de feridas foram coletadas em diversos intervalos de tempo, como está indicado na Figura, que mostra que a taxa de fechamento da ferida é significativamente menor em cada ponto de tempo, quando as células são tratadas com a muteína.

[0044] **Figura 6.** Muteína G_M1 inibe a diferenciação/conversão de células GITR- T CD4⁺ CD25⁻ nativas em células T regulatórias Foxp3 + CD4⁺, que é induzida por TGFβ nativo. A percentagem de células T regulatórias recuperadas nas culturas de células T é reduzida quase a zero quando as células T nativas são incubadas com 500 ng/ml da muteína. Esta concentração é de apenas 30 vezes maior do que a do TGFβ1 humano recombinante usado para induzir primariamente a conversão.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Projeto de muteínas TGFβ.

[0045] Os mutantes de TGFβ foram projetados computacionalmente usando técnicas de bioinformática. Como ponto de partida, foram usadas as estruturas relatadas do complexo ternário de TGFβ1 e TGFβ3 com o receptor de TGFβ. A energia de ligação das isoformas nativas e todas as possíveis variantes mutadas foram determinadas usando programas de bioinformática públicos. As muteínas G_M1 foram expressas em células CHO-K1 usando uma construção genética baseada em vetor lentiviral PLW que incluiu a região de dobradiça C-terminal e domínios Cγ2 e Cγ3 de uma IgG1 humana e cauda de histidina. G_M1 foi purificado por cromatografia de afinidade com a proteína A. Eles foram obtidos (Figura 1) com elevada pureza (> 95%).

Exemplo 2. Avaliação da ligação da muteína G_M1 a TβRII por ELISA.

[0046] Um teste de ELISA foi realizado com revestimento de TβRII (1 µg/ml) e revelado com anticorpo Fc anti-humano copulado a fosfatase alcalina. Como controle negativo, anticorpo irrelevante hR3 foi usado. A Figura 2 mostra que a muteína G_M1 retém a sua capacidade de ligação ao

receptor T β RII, que é similar à de TGF β 1 nativo.

Exemplo 3. Muteína G_M1 têm uma capacidade reduzida para sinalizar através de receptor T β RI (ALK5), e, portanto, para imitar a atividade biológica de TGF β nativo.

[0047] Comparou-se a inibição de proliferação de linhagem de células CTLL-2 dependente de IL2, induzida por TGF β mutante ou nativo. 5.000 células CTLL-2/cavidades foram estimuladas com rIL-2 (50U/ml) e cultivadas na presença das concentrações indicadas de TGF β 1 tipo selvagem ou muteína G_M1, durante 48 h. Depois, reagente azul de alamar foi adicionado à cultura e a sua redução foi medida a 540 e 630 nm.

[0048] Muteína G_M1 foi incapaz de inibir a proliferação de linhagem CTLL-2, em concentrações 200 vezes superiores às do TGF β 1 comercial usado como controle positivo de teste (Figura 3). Mostrou-se que capacidade da muteína G_M1 para inibir a proliferação de linhagem celular CTLL-2 é muito menor do que a de TGF β 1 comercial.

Exemplo 4. Muteína G_M1 é antagonista da sinalização de TGF β *in vitro*.

[0049] 5.000 células CTLL-2 /cavidades foram estimuladas com rIL-2 (50 U/ml) e cultivadas na presença de 2 pM de TGF β 1 de tipo selvagem e as concentrações indicadas de G_M1, ou controle de isótipo hR3MAb; ou o anticorpo anti-TGF β 1 como um controle positivo. Após 48 horas, o reagente azul de alamar foi adicionado à cultura e a sua redução foi medida a 540 e 630 nm.

[0050] A muteína G_M1, mas não o controle do isótipo MAb HR3, neutraliza a inibição da proliferação de linhagem de células CTLL-2-dependentes de IL2, causada por TGF β 1 nativo (Figura 4). O efeito neutralizante causado pela muteína é similar ao obtido com um anticorpo anti-TGF β 1, o qual foi usado como controle positivo da experiência.

Exemplo 5. A muteína G_M1 tem efeito antitumoral *in vitro*.

[0051] A capacidade da muteína G_M1 de inibir a migração de

linhagem celular de tumor de murino 4T1 foi avaliada em um teste *in vitro* de cicatrização de ferida (CC Liang et al, Nat Protoc. Two (2): 329-33, 2007). Células confluentes foram feridas por raspagem da monocamada de células com uma ponta de pipeta estéril. A muteína G_M1 ou TGFβ1 de tipo selvagem (como controle negativo) foi adicionada à cavidade. A Figura 5 mostra que a velocidade de fechamento da ferida é significativamente menor ($p < 0,05$ teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn em cada ponto de tempo) quando as células são tratadas com a muteína.

Exemplo 6. A muteína G_M1 inibe a diferenciação de células T CD4+ *naive* em células regulatórias Foxp3 CD4+ T induzidas por TGF β1 e IL2 nativos.

[0052] População *naive* CD4+ CD25-GITR- do baço de quatro camundongos C57/BL6 foi purificada por classificação de células. 5×10^4 destas células foram estimuladas com 3 ng/ml de anti-CD3 ligado à placa e 3 µg/mL de anti-CD28 solúvel, na presença de 5 ng/ml de IL-2 e de 5 ng/ml de TGFβ1 humano nativo. Nesta condição de cultura a percentagem de células T regulatórias recuperadas após 3 dias foi de 55,6%. O efeito da muteína nesta cultura foi avaliado em concentrações de 250 e 500 ng/mL. A percentagem de células T regulatórias Foxp3 + recuperadas, na presença ou ausência da muteína foi medida. A Figura 6 mostra como a percentagem de células T regulatórias recuperadas nas culturas de células T é reduzida quase a zero, na presença de muteína G_M1.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo que antagoniza a atividade dos ligantes TGF β 1 mediada pelo receptor ALK5, caracterizado pelo fato de que a sequência do dito polipeptídeo é selecionada do grupo consistindo de:

- SEQ ID NO: 18,
- SEQ ID NO: 69 e
- SEQ ID NO: 52.

2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser copulado a um fragmento de IgG1 humana compreendendo as mutações ala234 e ala235 no domínio C γ 2.

3. Composição farmacêutica para o tratamento de câncer, doenças associadas com fibrose e doenças infecciosas crônicas, caracterizada pelo fato de compreender:

- o polipeptídeo como definido na reivindicação 1 em uma faixa entre 50ng/mL a 10 μ g/mL e
- um veículo farmacêuticamente apropriado.

4. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de câncer, doenças associadas com fibrose e doenças infecciosas crônicas.

5. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de ser para uso para acentuar a resposta celular e/ou humoral às vacinas.

6. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a vacina a potenciar é uma vacina terapêutica para câncer.

FIGURA 1
Western blotting anti-TGF β 1

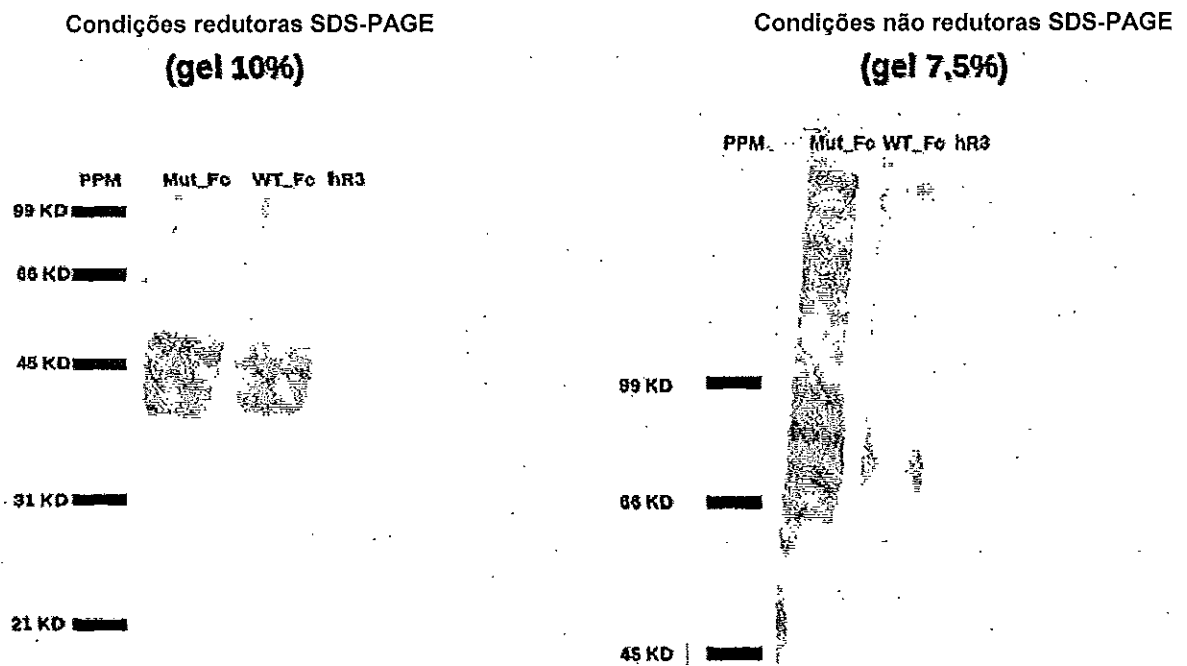


Figura 2

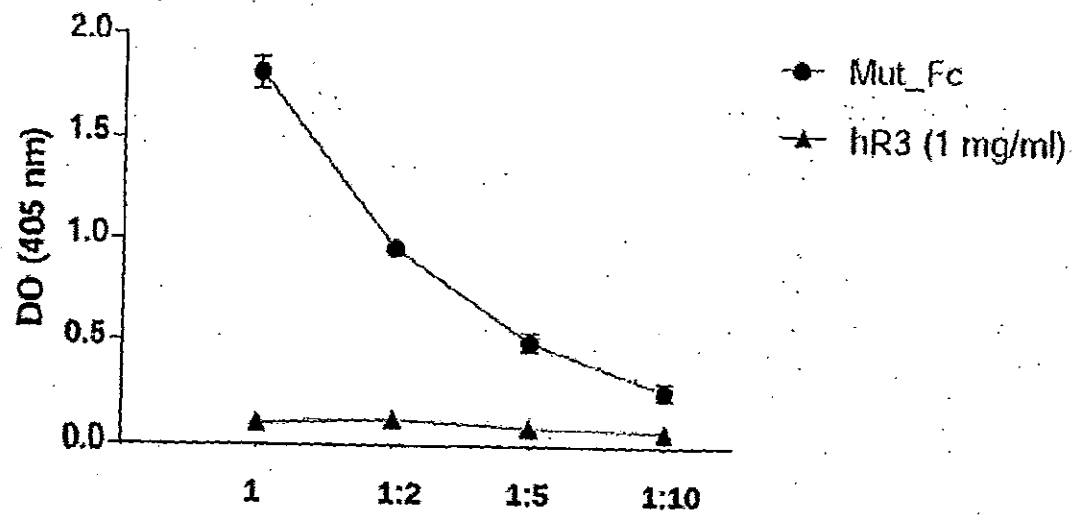


Figura 3

Inibição de proliferação de CTLL2
5.000 células/cavidades + IL2 (50 U/mL)

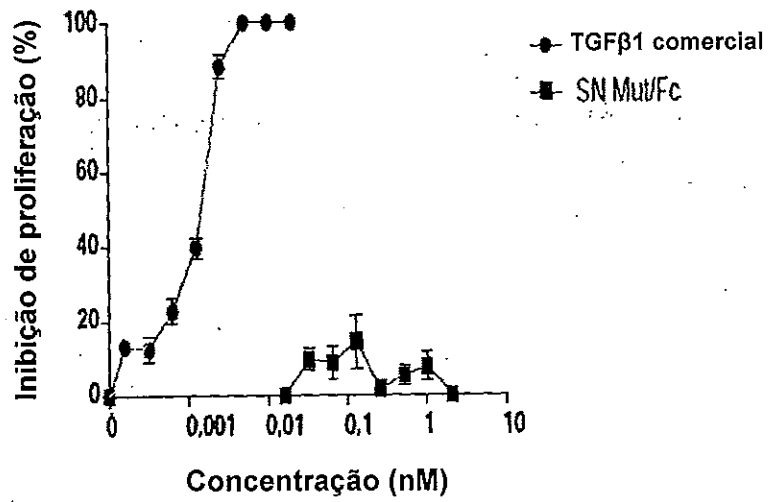


Figura 4

Neutralização da inibição da proliferação das
CTLL-2 induzida pelo TGFB1 comercial
(2×10^{-3} nM)

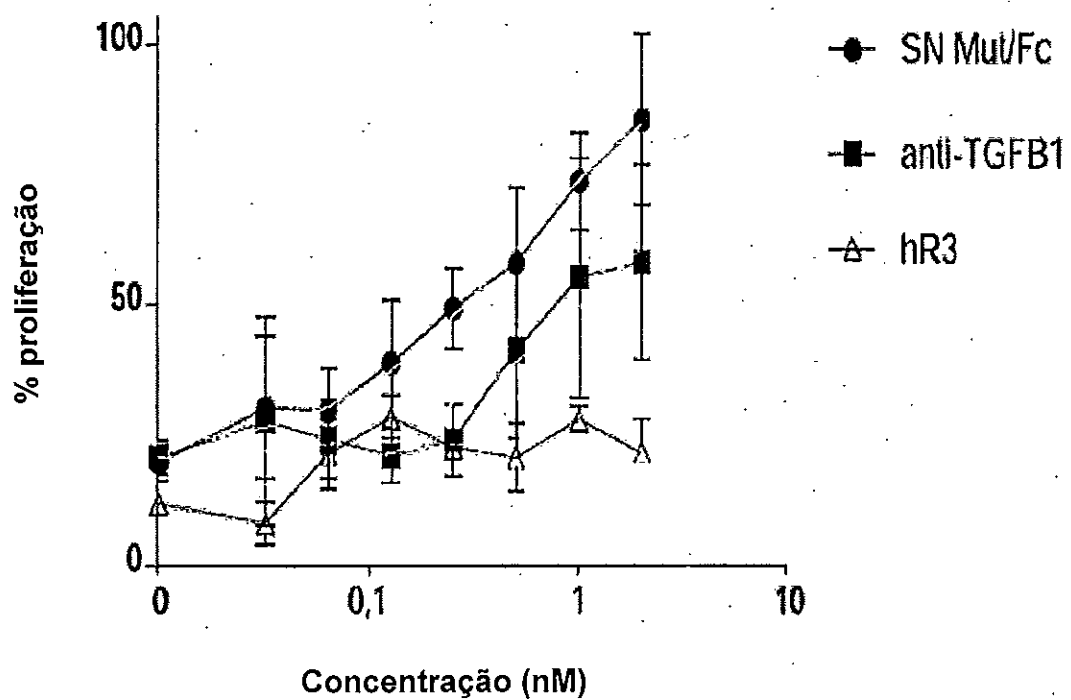


Figura 5

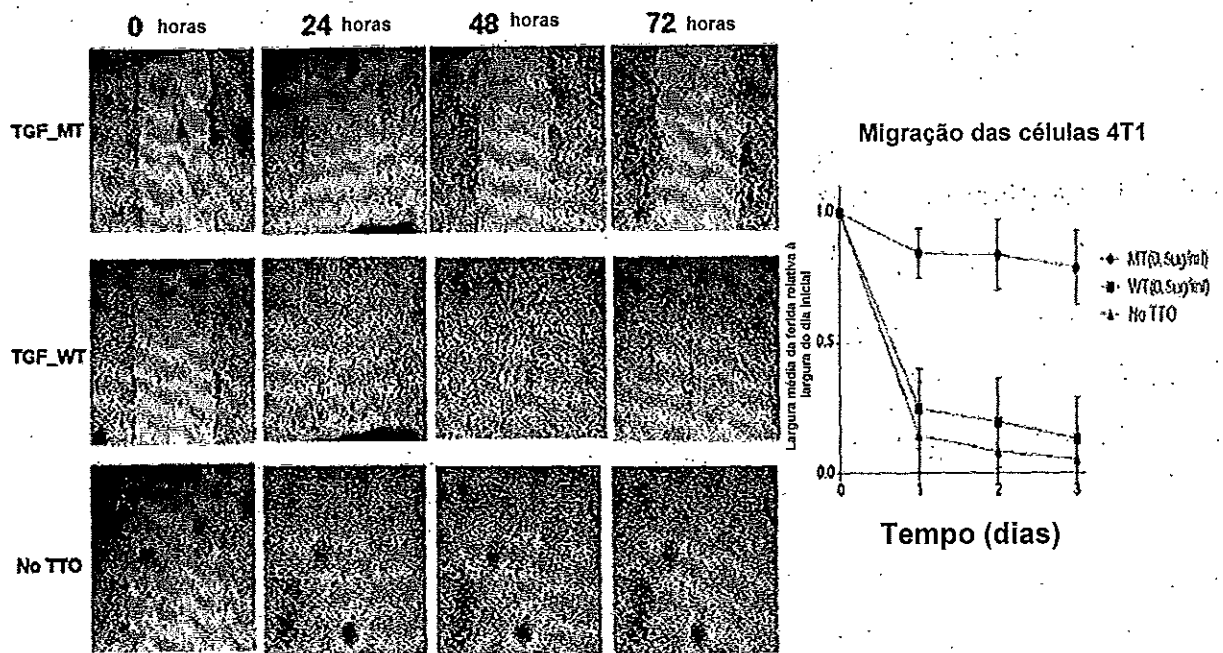


Figura 5

