



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

(21) BR 112020021791-3 A2



(22) Data do Depósito: 24/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 23/02/2021

(54) **Título:** PROTEÍNAS DE FUSÃO DE INTERLEUCINA 12 E COMPOSIÇÕES E MÉTODOS TERAPÊUTICOS DAS MESMAS

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/54; C07K 16/28; C12N 5/078.

(30) **Prioridade Unionista:** 25/04/2018 CN 201810376920.1.

(71) **Depositante(es):** IMMUNE TARGETING INC..

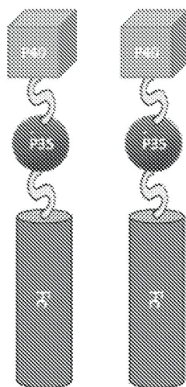
(72) **Inventor(es):** YANG-XIN FU; HUA PENG; DIYUAN XUE.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019028933 de 24/04/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/209965 de 31/10/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 23/10/2020

(57) **Resumo:** PROTEÍNAS DE FUSÃO DE INTERLEUCINA 12 E COMPOSIÇÕES E MÉTODOS TERAPÊUTICOS DAS MESMAS. A presente invenção refere-se a proteínas de fusão de Interleucina 12 e profármacos, e composições e métodos de preparação das mesmas, úteis no tratamento de várias doenças e distúrbios (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**“PROTEÍNAS DE FUSÃO DE INTERLEUCINA 12 E COMPOSIÇÕES
E MÉTODOS TERAPÊUTICOS DAS MESMAS”.**

Reivindicações de Prioridade e Pedidos Relacionados

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Chinês nº 201810376920.1, depositado em 25 de abril de 2018, cujo conteúdo inteiro é aqui incorporado por referência para todos os fins.

Campo Técnico da Invenção

[002] A presente invenção geralmente se refere a proteínas de fusão e seus usos terapêuticos. Mais particularmente, a invenção fornece novas proteínas de fusão de Interleucina 12 profármacos, e composições e métodos de preparação das mesmas, úteis no tratamento de várias doenças e distúrbios (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).

Antecedentes da Invenção

[003] A interleucina-12 (IL12), também conhecida como fator de maturação de linfócitos citotóxicos (CLMF), foi identificada pela primeira vez em 1989 como um fator estimulador de células exterminadoras naturais (NK) com múltiplas atividades biológicas em linfócitos do sangue periférico. A IL12 é produzida em resposta à infecção por uma variedade de células do sistema imunológico, incluindo células fagocíticas, células B e células dendríticas ativadas. (Colombo *et al.* **2002** *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13: 155-168.) A IL12 desempenha um papel essencial na mediação da interação dos braços inatos e adaptativos do sistema imunológico, agindo nas células T e nas células exterminadoras naturais (NK), aumentando a proliferação e atividade de linfócitos citotóxicos e a produção de outras citocinas inflamatórias, especialmente interferon- γ .

[004] IL12 é uma molécula heterodimérica composta por uma cadeia α (a subunidade p35) e uma cadeia β (a subunidade p40)

covalentemente ligada por uma ponte dissulfeto para formar o heterodímero biologicamente ativo de 74 kDa. Em humanos e camundongos, IL12 é mostrado ser um potente ativador da atividade de células exterminadoras naturais (NK) (Kobayashi, *et al.* **1989** *J. Exp. Med.* 170: 827-845) e um indutor principal de IFN- γ de NK e Linfócitos T (Chan, *et al.* **1991** *J. Exp. Med.* 173: 869-879), uma citocina com importantes capacidades de ativação de células imunológicas. IFN- γ também é um mediador essencial dos efeitos antiangiogênicos atribuídos à IL12 (Voest, *et al.* **1995** *J. Natl Cancer Inst.* 87:581-586; Majewski, *et al.* **1996** *J. Invest. Dermatol.* 106:1114-1118).

[005] Estudos mostraram que IL12 aumenta a morte de células tumorais mediada por células imunes especificamente direcionadas a alvos tumorais por anticorpos antitumorais (citotoxicidade celular dependente de anticorpos, ADCC) (Lieberman, *et al.* **1991** *J. Surg. Res.* 50: 410-415). IL12 estimula a produção de óxido nítrico *in vivo*, resultando em progressão tumoral retardada em camundongos (Wigginton, *et al.* **1996** *Cancer Res.* 56: 1131-1136). A produção de IL12 endógena também foi documentada para diminuir gradualmente à medida que a carga tumoral aumenta (Handel-Fernandez, *et al.* **1997** *J. Immunol.* 158: 280-286), formando assim uma razão para fornecer IL12 a pacientes com câncer para reconstituir as respostas antitumorais mediadas por células.

[006] IL12 também foi relatado como um potente inibidor da angiogênese induzida por tumor (Voest, *et al.* **1995** *supra*; Majewski, *et al.* **1996** *supra*) demonstrando inibição significativa *in vivo* da formação de vasos sanguíneos tumorais em camundongos mediada por proteína-10 induzível por IFN γ (IP-10; Sgadari, *et al.* **1996** *Blood* 87: 3877-3882), uma quimiocina que possui um efeito antiangiogênico potente na vasculatura de tumores em crescimento (Angiolillo, *et al.*

1996 *Ann NY Acad. Sci.* 795: 158- 167; Arenberg, *et al.* **1996** *J. Exp. Med.* 184: 981-992. *In vitro*, inibe a formação de estruturas semelhantes a tubos por células endoteliais (Angiolillo, *et al.* **1995** *J. Exp. Med.* 182: 155- 162). *In vivo*, a indução de IP-10 por IF12 resulta em necrose tumoral central com vasos sanguíneos circundantes mostrando espessamento da íntima, apoptose de células endoteliais e oclusão parcial a completa dos lúmens dos vasos por trombose (Angiolillo, *et al.* **1996** *supra*; Dias, *et al.* **1998** *Int. J. Cancer* 75: 151-157). IF12 também mostrou exercer efeitos antiangiogênicos através do seu papel como um regulador da produção de VEGF e metaloproteinase de matriz (MMP) (Dias, *et al.* **1998** *Int. J. Cancer* 78: 361-365).

[007] Embora IF12 tenha mostrado potente efeito antitumoral em modelos pré-clínicos, nos ensaios clínicos, no entanto, a administração sistêmica de IF12 recombinante resultou em efeitos colaterais graves, como febre, reações gastrointestinais, linfopenia e função hepática anormal grave, e mortes de pacientes foram atribuídas à administração de IF12 devido à sua toxicidade grave. (Lasek, *et al.* **2014** *Cancer Immunol Immunother.* 63 (5): 419–435.)

[008] A terapêutica e os métodos atualmente disponíveis para hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética são inadequados. Permanece uma necessidade urgente e contínua de novas e melhores terapêuticas para tratar eficazmente essas doenças e condições.

Sumario da Invenção

[009] A invenção é baseada em parte na descoberta surpreendente de novas proteínas de fusão e seus usos terapêuticos. Novas proteínas de fusão de IF12 e profármacos das mesmas, composições e métodos de preparação das mesmas, são aqui descritas que são úteis no tratamento de várias doenças e distúrbios,

por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética, com efeitos colaterais reduzidos e toxicidades fora do alvo.

[0010] Em um aspecto, a invenção geralmente se refere a uma proteína de fusão. A proteína de fusão compreende: uma primeira unidade estrutural: uma ou duas subunidades de IL12 selecionadas de subunidades P35 e P40, em que a primeira unidade estrutural está localizada no N-terminal da proteína de fusão; uma segunda unidade estrutural: um fragmento Fc de anticorpo, em que a segunda unidade estrutural está localizada no C-terminal da proteína de fusão; e um primeiro segmento de ligação que liga covalentemente a primeira unidade estrutural e a segunda unidade estrutural ou liga covalentemente as duas subunidades da primeira unidade estrutural.

[0011] Em outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma proteína homodimérica ou heterodimérica, que compreende uma proteína de fusão aqui descrita.

[0012] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma proteína substancialmente purificada, como uma proteína de fusão ou um fragmento, aqui descrito.

[0013] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a um polinucleotídeo que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento desta, aqui descrito.

[0014] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento desta, aqui descrito.

[0015] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, descrita aqui e um excipiente, veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[0016] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a

uma composição farmacêutica compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento desta, aqui descrita e um excipiente, veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[0017] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a um método para tratar uma doença ou condição. O método compreende a administração a um paciente em necessidade de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polinucleotídeo que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrito, em que a doença ou condição é selecionada de hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética.

[0018] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere ao uso de uma proteína, como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrita para o tratamento ou redução de uma doença ou distúrbio (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).

[0019] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere ao uso de um polinucleotídeo que codifica uma proteína, como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrito para o tratamento ou redução de uma doença ou distúrbio (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).

[0020] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere ao uso de uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrita e um excipiente, veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável, na preparação de um medicamento para tratar ou reduzir uma doença ou distúrbio (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).

[0021] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere ao uso de um polinucleotídeo que codifica uma proteína, como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrito e um

excipiente, veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, na preparação de um medicamento para tratar ou reduzir uma doença ou distúrbio (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).

[0022] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma linhagem celular compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento desta, aqui descrita.

[0023] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a um método para preparar uma proteína, compreendendo a cultura da linhagem celular. Em certas modalidades, o método compreende ainda purificar ou isolar uma proteína produzida, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrito.

[0024] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a um método para preparar uma proteína. O método compreende: fornecer um vetor de expressão que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrito; introdução do vetor de expressão em uma célula hospedeira; cultivar a célula hospedeira em meio sob condições suficientes para expressar a proteína; e purificar a proteína da célula ou meio hospedeiro.

[0025] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma proteína isolada produzida por um método aqui descrito.

Breve Descrição dos Desenhos

[0026] A **FIGURA 1** mostra um diagrama esquemático da estrutura do profármaco de dímero IL12-Fc: Homodímero-IL12-Fc (Homo IL12) em forma de série.

[0027] A **FIGURA 2** mostra um diagrama esquemático da estrutura do profármaco de dímero IL12-Fc: Heterodímero-IL12-Fc (Het IL12) em forma paralela, Fc-k é uma abreviação para *Fc-knob* e Fc-h é abreviação para *hole Fc*.

[0028] A **FIGURA 3** mostra um diagrama esquemático da estrutura do profármaco de dímero Homodímero-IL12-R β 1 (Homo-R1).

[0029] A **FIGURA 4** mostra um diagrama esquemático da estrutura do profármaco de dímero Homodímero-IL12-Rp2 (Homo-R2).

[0030] A **FIGURA 5** mostra um diagrama esquemático da estrutura do profármaco de dímero Heterodímero-IL12-Rp1/Rp2 (Het-R1/R2), Fc-k é uma abreviação para *Fc-knob* e Fc-h é uma abreviação para *hole* Fc.

[0031] A **FIGURA 6** mostra um diagrama esquemático da estrutura do profármaco de dímero Heterodímero-IL12-Rp1 (Het-R1), Fc-k é uma abreviatura para *Fc-knob* e Fc-h é abreviação de *fc-hole*.

[0032] A **FIGURA 7** mostra um diagrama esquemático da estrutura do profármaco de dímero Heterodímero-IL12-Rp2 (Het-R2), Fc-k é a abreviação de *Fc-knob* e Fc-h é a abreviação de *fc-hole*.

[0033] A **FIGURA 8** mostra dados exemplares de resultados de eletroforese SDS-PAGE da expressão das sete proteínas de fusão nas **Figuras 1 ~ 7**.

[0034] A **FIGURA 9** mostra dados exemplares de que a injeção de IL12-Fc, não ligada ao receptor de IL12, elimina completamente tumores MC38, e Het IL12 possui um efeito de depuração mais forte do que Homo IL12.

[0035] A **FIGURA 10** mostra dados exemplares de que Het IL12 possui uma citotoxicidade mais alta do que Homo IL12.

[0036] A **FIGURA 11** mostra dados exemplares de que Het-R1, Het-R2 e Het-R1/R2 eliminam efetivamente tumores MC38.

[0037] A **FIGURA 12** mostra dados exemplares de que o profármaco Het IL12 ligado ao receptor de IL12 possui menos efeitos colaterais quando administrado sistemicamente.

[0038] A **FIGURA 13** mostra dados exemplares de resultados de eletroforese SDS-PAGE da expressão de Het-R1 humano e Het-R1/R2

com ou sem digestão com MMP14.

[0039] A **FIGURA 14** mostra dados exemplares de que (A) Het-R1 humano após digestão de MMP14 exibe atividade semelhante a Het IL12 e IL12 recombinante *in vitro* (B) Het-R1/R2 humano após digestão de MMP14 exibe atividade semelhante a Het IL12 e IL12 recombinante usando uma linhagem celular repórter HEK Blue-IL12.

Definições

[0040] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento possui o mesmo significado como comumente entendido por alguém versado na técnica à qual esta invenção pertence. Os seguintes termos, a menos que indicado de outra forma de acordo com o contexto em que os termos são encontrados, pretendem ter os seguintes significados.

[0041] Quando nomes comerciais são usados neste documento, o nome comercial inclui a formulação do produto, o fármaco genérico e o (s) ingrediente (s) farmacêutico (s) ativo (s) do produto com nome comercial, a menos que indicado de outra forma pelo contexto.

[0042] Os intervalos aqui fornecidos são entendidos como abreviações para todos os valores dentro da faixa. Por exemplo, uma faixa de 1 a 50 é entendida como incluindo qualquer número, combinação de números ou subfaixa do grupo que consiste em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50.

[0043] Quando aqui usado, "pelo menos" um valor específico é entendido como sendo esse valor e todos os valores maiores do que esse valor.

[0044] Quando aqui usado, "mais de um" é entendido como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 100, etc., ou qualquer valor entre eles.

[0045] Nesta especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o/a" incluem referência no plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[0046] A menos que especificamente declarado ou óbvio a partir do contexto, quando aqui usado, o termo "cerca de" é entendido como dentro de uma faixa de tolerância normal na técnica, por exemplo, dentro de 2 desvios padrão da média. Sobre pode ser entendido como dentro de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 % ou 0,01 % do valor declarado. A menos que de outra forma claro do contexto, todos os valores numéricos aqui fornecidos podem ser modificados pelo termo cerca de.

[0047] A menos que especificamente declarado ou óbvio a partir do contexto, quando aqui usado, o termo "ou" é entendido como inclusivo.

[0048] O termo "compreendendo", quando usado para definir composições e métodos, pretende significar que as composições e métodos incluem os elementos recitados, mas não excluem outros elementos. O termo "consistindo essencialmente em", quando usado para definir composições e métodos, deve significar que as composições e métodos incluem os elementos recitados e excluem outros elementos de qualquer significado essencial para as composições e métodos. Por exemplo, "consistindo essencialmente em" refere-se à administração dos agentes farmacologicamente ativos expressamente recitados e exclui os agentes farmacologicamente ativos não expressamente recitados. O termo que consiste essencialmente em não exclui agentes farmacologicamente inativos ou inertes, por exemplo, excipientes, veículos ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis. O termo "consistindo em", quando usado para definir composições e métodos, deve significar a exclusão de elementos vestigiais de outros ingredientes e etapas substanciais

do método. As modalidades definidas por cada um desses termos de transição estão dentro do escopo desta invenção.

[0049] Quando aqui usado, o termo "agonista" se refere a um composto que, em combinação com um receptor, pode produzir uma resposta celular. Um agonista pode ser um ligante que se liga diretamente ao receptor. Alternativamente, um agonista pode combinar-se com um receptor indiretamente, por exemplo, (a) formando um complexo com outra molécula que se liga diretamente ao receptor, ou (b) de outra forma resultando na modificação de outro composto de modo que o outro composto se ligue diretamente ao receptor.

[0050] Quando aqui usado, o termo "antagonista" refere-se a um composto que compete com um agonista ou agonista inverso pela ligação a um receptor, bloqueando assim a ação de um agonista ou agonista inverso no receptor. No entanto, um antagonista não possui efeito sobre a atividade do receptor constitutivo.

[0051] Quando aqui usado, o termo "anticorpo" se refere a moléculas que são capazes de se ligar a um epítopo ou determinante antigênico. O termo pretende incluir anticorpos inteiros e seus fragmentos de ligação ao antígeno. O termo abrange policlonais, monoclonais, quiméricos, Fabs, Fvs, anticorpos de cadeia única e projetos de cadeia variável de imunoglobulina única ou múltipla ou domínio CDR, bem como anticorpos biespecíficos e multiespecíficos. Os anticorpos podem ser de qualquer origem animal. De preferência, os anticorpos são de mamíferos, por exemplo, humano, murino, coelho, cabra, porquinho da índia, camelo, cavalo e similares, ou outros animais adequados. Os anticorpos podem reconhecer antígenos polipeptídicos ou polinucleotídicos. O termo inclui fragmentos ativos, incluindo, por exemplo, um fragmento de ligação ao antígeno de uma imunoglobulina, uma região variável e/ou constante

de uma cadeia pesada, uma região variável e/ou constante de uma cadeia leve, uma região determinante de complementaridade (cdr), e uma região de estrutura. Os termos incluem preparações de anticorpos policlonais e monoclonais, bem como preparações incluindo anticorpos híbridos, anticorpos alterados, anticorpos quiméricos, moléculas de anticorpos híbridos, fragmentos F (ab) 2 e F (ab); Moléculas Fv (por exemplo, heterodímeros não covalentes), construções de fragmentos de anticorpos diméricos e triméricos; minicorpos, moléculas de anticorpos humanizados e quaisquer fragmentos funcionais obtidos a partir de tais moléculas, em que tais fragmentos retêm ligação específica.

[0052] Quando aqui usado, o termo "antígeno", significa qualquer substância que faz com que o sistema imunológico produza anticorpos ou respostas imunológicas específicas mediadas por células contra ele. Um antígeno associado a uma doença é qualquer substância associada a qualquer doença que faça com que o sistema imunológico produza anticorpos ou uma resposta mediada por células específicas contra ele. Um antígeno é capaz de ser reconhecido pelo sistema imune e/ou capaz de induzir uma resposta imunológica humoral e/ou resposta imunológica celular levando à ativação de linfócitos B e/ou T. Um antígeno pode ter um ou mais epítomos (epítomos de células B e/ou T). Um antígeno irá preferencialmente reagir, tipicamente de uma maneira altamente seletiva, com seu anticorpo ou TCR correspondente e não com a multidão de outros anticorpos ou TCRs que podem ser evocados por outros antígenos. Os antígenos, quando aqui usados, também podem ser misturas de vários antígenos individuais.

[0053] Quando aqui usado, o termo entidade "biologicamente ativa", ou uma entidade com "atividade biológica", é aquela com funções estruturais, regulatórias ou bioquímicas de uma molécula de

ocorrência natural ou qualquer função relacionada ou associada a um processo metabólico ou fisiológico. Um polipeptídeo biologicamente ativo ou fragmento do mesmo inclui um que pode participar de um processo ou reação biológica e/ou pode produzir um efeito desejado. A atividade biológica pode incluir uma atividade desejada melhorada ou uma atividade indesejável diminuída. Por exemplo, uma entidade demonstra atividade biológica quando participa de uma interação molecular com outra molécula, quando possui valor terapêutico no alívio de uma condição de doença, quando possui valor profilático na indução de uma resposta imunológica, ou quando possui valor diagnóstico e/ou prognóstico valor na determinação da presença de uma molécula. Uma proteína ou polipeptídeo biologicamente ativo pode ser de ocorrência natural ou pode ser sintetizado a partir de componentes conhecidos, por exemplo, por síntese recombinante ou química e pode incluir componentes heterólogos.

[0054] Quando aqui usados, os termos "câncer" e "canceroso" referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, sarcoma, blastoma e leucemia. Exemplos mais particulares de tais cânceres incluem carcinoma de células escamosas, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer cervical, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, carcinoma de cólon e câncer de cabeça e pescoço.

[0055] Quando aqui usado, o termo "célula" refere-se a qualquer célula procariótica, eucariótica, célula primária ou linhagem celular imortalizada, qualquer grupo de tais células como em um tecido ou um órgão. De preferência, as células são de origem mamífera (por exemplo, humana) e podem ser infectadas por um ou mais patógenos.

[0056] Quando aqui usado, o termo "coadministrar" se refere à

presença de dois agentes farmacológicos no sangue ao mesmo tempo. Os dois agentes farmacológicos podem ser administrados simultaneamente ou sequencialmente.

[0057] Quando aqui usado, o termo "coexpresso" pretende significar que dois polipeptídeos distintos são expressos simultaneamente em uma célula hospedeira de modo que os dois polipeptídeos possam interagir ou se ligar na célula hospedeira ou no meio de cultura da célula hospedeira e formar um complexo.

[0058] Quando aqui usados, os termos "doença" ou "distúrbio" referem-se a uma condição patológica, por exemplo, uma que pode ser identificada por sintomas ou outros fatores de identificação como divergentes de um estado saudável ou normal. O termo "doença" inclui distúrbios, síndromes, condições e lesões. As doenças incluem, mas não estão limitadas a doenças proliferativas, inflamatórias, imunológicas, metabólicas, infecciosas e isquêmicas.

[0059] Quando aqui usado, o termo "quantidade eficaz" de um agente ativo se refere a uma quantidade suficiente para eliciar a resposta biológica desejada. Como será apreciado por aqueles versados na técnica, a quantidade eficaz de um composto da invenção pode variar dependendo de fatores como o ponto final biológico desejado, a farmacocinética do composto, a doença a ser tratada, o modo de administração, e o paciente.

[0060] Quando aqui usado, o termo "expressão de uma molécula de ácido nucleico" refere-se à conversão da informação contida na molécula de ácido nucleico em um produto gênico. O produto gênico pode ser o produto transcricional direto de um gene (por exemplo, mRNA, tRNA, rRNA, RNA antissenso, ribozima, RNA estrutural ou qualquer outro tipo de RNA) ou um peptídeo ou polipeptídeo produzido pela tradução de um mRNA. Os produtos gênicos também incluem RNAs que são modificados por processos como capeamento,

poliadenilação, metilação e edição; e proteínas modificadas por, por exemplo, metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, ADP-ribosilação, miristilação e glicosilação.

[0061] Quando aqui usado, o termo "célula hospedeira" refere-se a uma célula individual ou uma cultura de células que pode ser ou foi um receptor de qualquer vetor (s) recombinante (s) ou polinucleotídeo (s) isolado (s). Uma célula hospedeira pode ser uma célula transfectada, transformada, transduzida ou infectada de qualquer origem, incluindo células procarióticas, eucarióticas, de mamíferos, aves, insetos, plantas ou bactérias, ou pode ser uma célula de qualquer origem que pode ser usada para propagar um ácido nucleico aqui descrito. As células hospedeiras incluem a progênie de uma única célula hospedeira, e a progênie pode não ser necessariamente completamente idêntica (em morfologia ou em complemento de DNA total) à célula-mãe original devido à mutação e/ou mudança natural, acidental ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transfectadas ou infectadas *in vivo* ou *in vitro* com um vetor recombinante ou um polinucleotídeo da invenção. Uma célula hospedeira que compreende um vetor recombinante da invenção pode ser chamada de "célula hospedeira recombinante".

[0062] As células hospedeiras incluem, sem limitação, as células de mamíferos, plantas, insetos, fungos e bactérias. As células bacterianas incluem, sem limitação, as células de bactérias Gram-positivas, como espécies do gênero *Bacillus*, *Streptomyces* e *Staphylococcus* e células de bactérias Gram-negativas, como células do gênero *Escherichia* e *Pseudomonas*. As células fúngicas incluem, de preferência, células de levedura, tais como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha*. As células de inseto incluem, sem limitação, células de *Drosophila* e células Sf9. As células vegetais incluem, entre outras, células de plantas de cultivo, como cereais,

plantas medicinais ou ornamentais ou bulbos. Células de mamífero adequadas para a presente invenção incluem linhagens celulares epiteliais (porcina, etc.), linhagens celulares de osteossarcoma (humano, etc.), linhagens celulares de neuroblastoma (humano, etc.), carcinomas epiteliais (humanos, etc.), células gliais (murino, etc.), linhagens celulares de fígado (macaco, etc.). Células de CHO (ovário de hamster chinês), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 ou PER.C6, células NTERA-2 de ECCs humanas, células D3 da linhagem de mESCs, células-tronco embrionárias humanas, tais como HS293 e BGV01, SHEF1, SHEF2 e HS181, células NIH3T3, 293T, REH e MCF-7 e células hMSCs.

[0063] Quando aqui usado, o termo "Fc" refere-se a uma molécula ou sequência que compreende a sequência de um fragmento de não ligação ao antígeno do anticorpo inteiro, seja na forma monomérica ou multimérica. A fonte de imunoglobulina original do Fc nativo é preferencialmente de origem humana e pode ser qualquer uma das imunoglobulinas (por exemplo, IgG1, IgG2). Os Fc's nativos são constituídos por polipeptídeos monoméricos que podem ser ligados em formas diméricas ou multiméricas por associação covalente (isto é, ligações dissulfeto) e não covalente. O número de ligações dissulfeto intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas Fc nativas varia de 1 a 4, dependendo da classe (por exemplo, IgG, IgA, IgE) ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2).

[0064] Quando aqui usados, os termos "domínio Fc" ou "região Fc" referem-se à região "cristalizável do fragmento" da cadeia pesada de imunoglobulina. Geralmente, um domínio Fc é capaz de interagir com um segundo domínio Fc para formar um complexo dimérico. O domínio Fc pode ser capaz de se ligar a receptores de superfície celular chamados receptores Fc e/ou proteínas do sistema complemento ou pode ser modificado para reduzir ou aumentar essas

atividades de ligação. O domínio Fc pode ser derivado de isótipos de anticorpos IgG, IgA, IgD, IgM ou IgE e efetuar atividade imunológica incluindo opsonização, lise celular, desgranulação de mastócitos, basófilos e eosinófilos, e outros processos dependentes do receptor Fc; ativação da via do complemento; e estabilidade da proteína *in vivo*.

[0065] "Domínio Fc" engloba moléculas e sequências Fc nativas e variantes Fc conforme definido neste documento. Tal como acontece com as variantes de Fc e Fc's nativos, o termo "domínio Fc" inclui moléculas na forma monomérica ou multimérica, digeridas a partir do anticorpo inteiro ou produzidas pela expressão do gene recombinante ou por outros meios.

[0066] Foi relatado que as proteínas de fusão Fc combinam as regiões Fc de IgG com os domínios de outra proteína, como várias citocinas e receptores solúveis (por exemplo, Capon *et al.* **1989** *Nature* 337: 525-531; Chamow *et al.* **1996** *Trends Biotechnol.* 14: 52-60; Patentes Norte-americanas Nos. 5.116.964 e 5.541.087).

[0067] O uso de fusões Fc é conhecido na técnica (por exemplo, Patentes Norte-americanas Nos. 7.754.855; 5.480.981; 5.808.029; WO7/23614; WO98/28427 e referências nele citadas. As proteínas de fusão Fc podem incluir moléculas Fc variantes (por exemplo, como descrito em Patente Norte-americana 7.732.570). As proteínas de fusão Fc podem ser solúveis no plasma ou podem se associar à superfície celular de células com receptores Fc específicos.

[0068] Quando aqui usado, o termo "variante de Fc" refere-se a uma molécula ou sequência que é modificada a partir de um Fc nativo, mas ainda compreende um sítio de ligação para o receptor de salvamento, FcRn. Os Pedidos internacionais WO 97/34631 (publicado em 25 de setembro de 1997) e WO 96/32478 descrevem variantes Fc exemplares, bem como a interação com o receptor de salvamento, e são aqui incorporados por referência. Assim, o termo "variante de Fc"

compreende uma molécula ou sequência que é humanizada a partir de um Fc nativo não humano. Além disso, um Fc nativo compreende sítios que podem ser removidos porque fornecem características estruturais ou atividade biológica que não são necessárias para as moléculas de fusão da presente invenção. Assim, em certas modalidades, o termo "variante de Fc" compreende uma molécula ou sequência que carece de um ou mais sítios Fc nativos ou resíduos que afetam ou estão envolvidos na (1) formação da ligação dissulfeto, (2) incompatibilidade com uma heterogeneidade N-terminal de célula hospedeira selecionada (3) após expressão em uma célula hospedeira selecionada, (4) glicosilação, (5) interação com complemento, (6) ligação a um receptor Fc diferente de um receptor de salvamento ou (7) citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). As variantes de Fc são descritas em mais detalhes a seguir.

[0069] Quando aqui usado, o termo "proteína de fusão" refere-se a polipeptídeos que compreendem duas ou mais regiões de proteínas diferentes ou heterólogas ligadas covalentemente (ou seja, "fundidas") por método recombinante, químico ou outro método adequado. Se desejado, a molécula de fusão pode ser fundida em um ou vários sítios através de um peptídeo ou outro segmento de ligação ou sequência. Por exemplo, um ou mais ligantes peptídicos podem ser usados para auxiliar na construção de uma proteína de fusão.

[0070] Quando aqui usado, o termo "teor de GC" refere-se à porcentagem de uma sequência de ácido nucleico composta por resíduos de desoxiguanosina (G) e/ou desoxicitidina (C) desoxirribonucleosídeos, ou guanosina (G) e/ou citidina ribonucleosídeos (C).

[0071] Quando aqui usado, o termo "dosagem alta" significa pelo menos 5 % (por exemplo, pelo menos 10 %, 20 %, 50 %, 100 %, 200 % ou mesmo 300 %) mais do que a dosagem padrão mais alta

recomendada de um composto particular para o tratamento de qualquer doença ou condição humana.

[0072] Quando aqui usado, o termo "resposta imunológica" refere-se a um processo pelo qual as células imunes são estimuladas e/ou recrutadas do sangue para tecidos linfoides, bem como para tecidos não linfoides por meio de um processo multifatorial que envolve adesivo e/ou etapas de ativação distintas. As condições de ativação causam a liberação de citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e outros fatores, regulam positivamente a expressão de adesão e outras moléculas de ativação nas células imunes, promovem a adesão, alterações morfológicas e/ou extravasamento concomitante à quimiotaxia através dos tecidos, aumentam a proliferação celular e atividade citotóxica, estimula a apresentação de antígenos e fornece outras alterações fenotípicas, incluindo a geração de tipos de células de memória. Resposta imunológica também se refere à atividade das células imunes para suprimir ou regular a atividade inflamatória ou citotóxica de outras células imunes. A resposta imunológica refere-se à atividade das células imunes *in vivo* ou *in vitro*.

[0073] Os termos "idêntico" ou porcentagem de "identidade", no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou sequências polipeptídicas, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são iguais ou possui uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos que são mesmo (isto é, cerca de 70 % de identidade, de preferência 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou maior identidade sobre uma região especificada (por exemplo, de uma sequência IL12 ou IL12R), quando comparada e alinhada para correspondência máxima em uma janela de comparação ou região designada), conforme medido usando algoritmos de comparação de sequência BLAST ou BLAST 2.0 com parâmetros padrão descritos

abaixo, ou por alinhamento manual e inspeção visual. Essas sequências são então consideradas "substancialmente idênticas". Essa definição também se refere a, ou pode ser aplicada, ao complemento de uma sequência teste. A definição também inclui sequências que possuem deleções e/ou adições, bem como aquelas que possuem substituições. Conforme descrito abaixo, os algoritmos preferidos podem ser responsáveis por lacunas e similares. De preferência, a identidade existe sobre uma região que possui pelo menos cerca de 25, 50, 75, 100, 150, 200 aminoácidos ou nucleotídeos de comprimento e, muitas vezes, sobre uma região que é 225, 250, 300, 350, 400, o ácidos ou nucleotídeos de comprimento ou ao longo do comprimento total de um aminoácido ou sequências de ácido nucleico.

[0074] Para comparação de sequência, normalmente uma sequência atua como uma sequência de referência, à qual as sequências de teste são comparadas. Ao usar um algoritmo de comparação de sequência, as sequências de teste e referência são inseridas em um computador, as coordenadas da subsequência são designadas, se necessário, e os parâmetros do programa do algoritmo da sequência são designados. De preferência, parâmetros de programa padrão podem ser usados ou parâmetros alternativos podem ser designados. O algoritmo de comparação de sequência então calcula a porcentagem de identidades de sequência para as sequências de teste relativas à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa.

[0075] Um exemplo preferido de algoritmo que é adequado para determinar a porcentagem de identidade de sequência e similaridade de sequência são os algoritmos BLAST, que são descritos em Altschul *et al.* 1977 *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402 e Altschul *et al.* 1990 *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, respectivamente. O software BLAST está

disponível ao público por meio do National Center for Biotechnology Information na rede mundial de computadores em ncbi.nlm.nih.gov/. Ambos os parâmetros padrão ou outros parâmetros não padrão podem ser usados. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeos) usa como padrão um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ e uma comparação de ambas as fitas. Para sequências de aminoácidos, o programa BLASTP usa como padrão um comprimento de palavra de 3 e expectativa (E) de 10, e a matriz de pontuação BLOSUM62 (veja, Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1989)) alinhamentos (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ e uma comparação de ambas as fitas.

[0076] Quando aqui usado, o termo "inibir" refere-se a qualquer redução mensurável da atividade biológica. Assim, quando aqui usado, "inibir" ou "inibição" pode ser referido como uma porcentagem de um nível normal de atividade.

[0077] Quando aqui usado, o termo "interleucina 12" ou "IL12" refere-se a um polipeptídeo que possui pelo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de IL12 de mamífero nativo que é biologicamente ativa, o que significa que a proteína mutada ("muteína") possui funcionalidade semelhante (75 % ou mais) àquela de uma proteína IL12 nativa em pelo menos um ensaio funcional.

[0078] Ensaio funcionais exemplificados de um polipeptídeo IL12 incluem a indução da produção de interferon-gama (IFN- γ), por exemplo, por células T ou células exterminadoras naturais (NK) e promoção da diferenciação de células T auxiliares-1 (Th1). Uma célula T auxiliar diferenciada em uma célula Th1 pode ser identificada por secreção de IFN- γ . O IFN- γ secretado por células T ou células NK

estimuladas por IL-12 pode ser convenientemente detectado, por exemplo, no soro ou sobrenadante de cultura de células usando ELISA. Os métodos e técnicas de ELISA são bem conhecidos na técnica, e kits para detectar IFN- γ estão disponíveis comercialmente (por exemplo, R&D Systems, Minneapolis, Minn.; Peprotech, Rocky Hill, N.J.; e Biosource Intl., Camarillo, Calif.). Veja também, Coligan, *et al.*, Current Methods in Immunology, 1991-2006, John Wiley & Sons; Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press; e The ELISA Guidebook, Crowther, ed., 2000, Humana Press.

[0079] Quando aqui usados, os termos uma molécula "isolada" (como um polipeptídeo ou polinucleotídeo) é aquela que foi manipulada para existir em uma concentração mais alta do que na natureza ou foi removida de seu ambiente nativo. Por exemplo, um anticorpo objeto é isolado, purificado, substancialmente isolado ou substancialmente purificado quando pelo menos 10 %, ou 20 %, ou 40 %, ou 50 %, ou 70 %, ou 90 % de materiais de anticorpo não objeto com que está associado na natureza foram removidos. Por exemplo, um polinucleotídeo ou um polipeptídeo naturalmente presente em um animal vivo não é "isolado", mas o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo separado dos materiais coexistentes de seu estado natural é "isolado". Além disso, as moléculas de DNA recombinante contidas em um vetor são consideradas isoladas para os fins da presente invenção. As moléculas de RNA isoladas incluem produtos de replicação de RNA *in vivo* ou *in vitro* de moléculas de DNA e RNA. As moléculas de ácido nucleico isoladas incluem ainda moléculas produzidas sinteticamente. Além disso, as moléculas de vetor contidas em células hospedeiras recombinantes também são isoladas. Assim, nem todas as moléculas "isoladas" precisam ser "purificadas".

[0080] Quando aqui usados, os termos "ligante" ou "segmento de

ligação" referem-se a uma molécula ou grupo que conecta duas outras moléculas ou grupos. Um ligante de peptídeo pode permitir que as moléculas ou grupos conectados adquiram uma configuração funcional. O peptídeo ligante compreende preferencialmente pelo menos dois aminoácidos, pelo menos três aminoácidos, pelo menos cinco aminoácidos, pelo menos dez aminoácidos, pelo menos 15 aminoácidos, pelo menos 20 aminoácidos, pelo menos 30 aminoácidos, pelo menos 40 aminoácidos, pelo menos 50 aminoácidos, pelo menos 60 aminoácidos, pelo menos 70 aminoácidos, pelo menos 80 aminoácidos, pelo menos 90 aminoácidos ou aproximadamente 100 aminoácidos.

[0081] Os componentes de uma proteína de fusão, tais como citocinas ou outras moléculas bioativas e quaisquer ligantes peptídicos, podem ser organizados de quase qualquer maneira, desde que a proteína de fusão tenha a função para a qual se destina. Em particular, cada componente de uma proteína de fusão pode ser espaçado de outro componente por pelo menos um segmento ou sequência de ligação peptídica adequada, se desejado. Além disso, a proteína de fusão pode incluir marcadores, por exemplo, para facilitar a modificação, identificação e/ou purificação da proteína de fusão. Proteínas de fusão mais específicas estão nos exemplos descritos abaixo.

[0082] Quando aqui usado, o termo "dosagem baixa" se refere a pelo menos 5 % a menos (por exemplo, pelo menos 10 %, 20 %, 50 %, 80 %, 90 % ou mesmo 95 %) do que a dosagem padrão mais baixa recomendada de um composto particular formulado para uma dada via de administração para o tratamento de qualquer doença ou condição humana. Por exemplo, uma dosagem baixa de um agente que é formulado para administração por inalação será diferente de uma dosagem baixa do mesmo agente formulado para administração oral.

[0083] Quando aqui usado, o termo "meio" ou "meios" inclui qualquer meio de cultura, solução, suporte sólido, semissólido ou rígido que pode suportar ou conter qualquer célula hospedeira, incluindo células hospedeiras bacterianas, células hospedeiras de levedura, células hospedeiras de inseto, células hospedeiras de plantas, células hospedeiras eucarióticas, células hospedeiras de mamíferos, células de CHO, células hospedeiras procarióticas, células hospedeiras de *E. coli* ou *Pseudomonas* e conteúdos celulares. Assim, o termo pode abranger meio no qual a célula hospedeira foi cultivada, por exemplo, meio no qual um polipeptídeo foi segregado, incluindo meio antes ou depois de uma etapa de proliferação. O termo também pode abranger tampões ou reagentes que contêm lisados de células hospedeiras, como no caso em que um polipeptídeo é produzido intracelularmente e as células hospedeiras são lisadas ou rompidas para liberar o polipeptídeo.

[0084] Quando aqui usado, o termo "modular" refere-se à produção, direta ou indiretamente, de um aumento ou diminuição, estimulação, inibição, interferência ou bloqueio em uma atividade medida quando comparado a um controle adequado. Um "modulador" de um polipeptídeo ou polinucleotídeo refere-se a uma substância que afeta, por exemplo, aumenta, diminui, estimula, inibe, interfere com, ou bloqueia uma atividade medida do polipeptídeo ou polinucleotídeo, quando comparado com um controle adequado. Por exemplo, um "modulador" pode se ligar a e/ou ativar ou inibir o alvo com afinidade mensurável ou afetar direta ou indiretamente a regulação normal da atividade de um receptor.

[0085] O termo "operacionalmente ligado" refere-se a uma ligação funcional entre uma primeira sequência de ácido nucleico e uma segunda sequência de ácido nucleico, de modo que a primeira e a segunda sequências de ácido nucleico sejam transcritas em uma única

sequência de ácido nucleico. As sequências de ácido nucleico operacionalmente ligadas não precisam ser fisicamente adjacentes umas às outras. O termo "operacionalmente ligado" também se refere a uma ligação funcional entre uma sequência de controle de expressão de ácido nucleico (tal como um promotor ou matriz de sítios de ligação de fator de transcrição) e uma sequência de ácido nucleico transcritível, em que a sequência de controle de expressão direciona a transcrição do ácido correspondente à sequência transcritível.

[0086] Quando aqui usado, o termo excipiente, veículo ou diluente "farmaceuticamente aceitável" refere-se a um material, composição ou veículo farmaceuticamente aceitável, tal como um enchimento líquido ou sólido, diluente, excipiente, solvente ou material encapsulante, envolvido no carregamento ou transporte do agente farmacêutico objeto de um órgão, ou porção do corpo, para outro órgão ou porção do corpo. Cada veículo deve ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação e não prejudicial ao paciente. Alguns exemplos de materiais que podem servir como veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem: açúcares, tais como lactose, glicose e sacarose; amidos, tais como amido de milho e amido de batata; celulose e seus derivados, tais como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose e acetato de celulose; tragacanto em pó; malte; gelatina; talco; excipientes, tais como manteiga de cacau e ceras para supositórios; óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de caroço de algodão, óleo de cártamo, óleo de sésamo, azeite, óleo de milho e óleo de soja; glicóis, tais como propileno glicol; polióis, tais como glicerina, sorbitol, manitol e polietileno glicol; ésteres, tais como oleato de etila e laurato de etila; ágar; agentes tamponantes, tais como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; ácido algínico; água sem pirogênio; solução salina isotônica; Solução de Ringer; Álcool etílico; soluções tampão de fosfato; e outras substâncias não tóxicas

compatíveis utilizadas em formulações farmacêuticas. Agentes umectantes, emulsificantes e lubrificantes, tais como lauril sulfato de sódio, estearato de magnésio e copolímero de óxido de polietileno-óxido de polipropileno, bem como agentes corantes, agentes de liberação, agentes de revestimento, agentes adoçantes, aromatizantes e perfumantes, conservantes e antioxidantes também podem estar presentes nas composições.

[0087] Quando aqui usados, os termos "polinucleotídeo", "molécula de ácido nucleico", "nucleotídeo", "oligonucleotídeo" e "ácido nucleico" são usados indistintamente aqui para se referir a formas poliméricas de nucleotídeos, incluindo ribonucleotídeos, bem como desoxirribonucleotídeos, de qualquer comprimento. Eles podem incluir sequências de hélice dupla, de fita simples ou tripla e incluem, mas não estão limitados a, cDNA de fontes virais, procarióticas e eucarióticas; mRNA; sequências de DNA genômico de fontes virais (por exemplo, vírus de DNA e retrovírus) ou procarióticas; RNAi; cRNA; moléculas antissenso; polinucleotídeos recombinantes; ribozimas; e sequências de DNA sintéticas. O termo também captura sequências que incluem qualquer um dos análogos de base conhecidos de DNA e RNA. Os nucleotídeos podem ser referidos por seus códigos de uma letra comumente aceitos.

[0088] Os polinucleotídeos não estão limitados a polinucleotídeos conforme aparecem na natureza, e também incluem polinucleotídeos onde análogos de nucleotídeos não naturais e ligações internucleotídeos aparecem. Uma molécula de ácido nucleico pode compreender moléculas de ácido nucleico modificadas (por exemplo, bases modificadas, açúcares e/ou ligantes internucleotídicos). Exemplos não limitantes deste tipo de estruturas não naturais incluem polinucleotídeos em que o açúcar é diferente da ribose, polinucleotídeos em que as ligações fosfodiéster 3'-5' e 2'-5'

aparecem, polinucleotídeos em que ligações invertidas (3'-3' e 5'-5') aparecem e estruturas ramificadas. Além disso, os polinucleotídeos da invenção incluem ligações internucleotídicas não naturais, tais como ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ligações C1-C4 alquilfosfonato do tipo metilfosfonato, fosforamidato, C1-C6 alquilfosfotriéster, fosforotioato e fosforoditioato. Em qualquer caso, os polinucleotídeos da invenção mantêm a capacidade de hibridizar com os ácidos nucleicos alvo de uma forma semelhante aos polinucleotídeos naturais.

[0089] A menos que indicado de outra forma ou óbvio a partir do contexto, uma sequência de ácido nucleico particular também abrange implicitamente suas variantes modificadas de forma conservativa (por exemplo, substituições de códons degenerados) e sequências complementares, bem como a sequência explicitamente indicada. As substituições degeneradas de códons podem ser obtidas gerando sequências nas quais a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída por resíduos de base mista e/ou desoxiinosina. (Batzer *et al.* **1991** *Nucleic Acid Res.* 19: 5081; Ohtsuka *et al.* **1985** *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608; Rossolini *et al.* **1994** *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98.)

[0090] Quando aqui usados, os termos "prevenir", "prevenindo" ou "prevenção" referem-se a um método para impedir, retardar, evitar ou interromper o início, incidência, gravidade ou recorrência de uma doença ou condição. Por exemplo, um método é considerado uma prevenção se houver uma redução ou retardo no início, incidência, gravidade ou recorrência de uma doença ou condição ou um ou mais sintomas dos mesmos em um indivíduo suscetível à doença ou condição em comparação com um indivíduo que não recebeu o método. O método descrito também é considerado uma prevenção se houver uma redução ou retardo no início, incidência, gravidade ou

recorrência de um ou mais sintomas de uma doença ou condição em um indivíduo suscetível doença ou condição após receber o método em comparação com a progressão do sujeito antes de receber o tratamento. A redução ou retardo no início, incidência, gravidade ou recorrência da osteoporose pode ser cerca de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % ou qualquer quantidade de redução entre eles.

[0091] Prevenção e similares não significam impedir que um indivíduo contraia a doença ou distúrbio específico. A prevenção pode exigir a administração de doses múltiplas. A prevenção pode incluir a prevenção da recorrência de uma doença em um indivíduo para o qual todos os sintomas da doença foram eliminados ou a prevenção da recorrência em uma doença recorrente-remitente.

[0092] Quando aqui usado, o termo "promotor" refere-se a uma região reguladora de DNA capaz de se ligar a RNA polimerase em uma célula de mamífero e iniciar a transcrição de uma sequência de codificação a jusante (direção 3') operacionalmente ligada a ela. Uma sequência promotora inclui o número mínimo de bases ou elementos necessários para iniciar a transcrição de um gene de interesse em níveis detectáveis acima dos antecedentes. Dentro da sequência do promotor pode haver um sítio de iniciação da transcrição, bem como domínios de ligação de proteínas (sequências de consenso) responsáveis pela ligação da RNA polimerase. Os promotores eucarióticos muitas vezes, mas nem sempre, contêm caixas "TATA" e caixas "CAT". Os promotores incluem aqueles que são naturalmente contíguos a uma molécula de ácido nucleico e aqueles que não são naturalmente contíguos a uma molécula de ácido nucleico. Além disso, o termo "promotor" inclui promotores indutíveis, promotores condicionalmente ativos, tais como um promotor cre-lox, promotores constitutivos e promotores específicos de tecido.

[0093] Quando aqui usados, os termos "proteína" e "polipeptídeo"

são usados indistintamente para se referir a um polímero de resíduos de aminoácidos e não estão limitados a um comprimento mínimo. Assim, peptídeos, oligopeptídeos, dímeros, multímeros e similares, estão incluídos na definição. Ambas as proteínas tamanho natural e seus fragmentos são abrangidos pela definição. Os termos também incluem modificações pós-expressão do polipeptídeo, por exemplo, glicosilação, acetilação, fosforilação e similares. Além disso, um polipeptídeo pode referir-se a uma proteína que inclui modificações, tais como deleções, adições e substituições (geralmente de natureza conservativa), à sequência nativa, desde que a proteína mantenha a atividade desejada. Essas modificações podem ser deliberadas ou podem ser acidentais. Os aminoácidos podem ser referidos aqui por seus símbolos de três letras comumente conhecidos ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

[0094] Quando aqui usado, o termo "purificado" refere-se a uma proteína que pode estar substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham ou interagem com a proteína como encontrada em seu ambiente de ocorrência natural, ou seja, uma célula nativa ou célula hospedeira no caso de uma proteína produzida de forma recombinante. Uma proteína que pode estar substancialmente livre de material celular inclui preparações de proteína com menos de cerca de 30 %, menos de cerca de 20 %, menos de cerca de 15 %, menos de cerca de 10 %, menos de cerca de 5 %, menos de cerca de 4 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 % ou menos do que cerca de 1 % (em peso seco) de proteína (s) contaminante (s). Quando uma proteína ou variante da mesma é produzida de forma recombinante pelas células hospedeiras, a proteína pode estar presente em cerca de 30 %, em cerca de 20 %, cerca de 15 %, cerca de 10 %, cerca de 5 %, cerca de 4 %, cerca de 3

%, cerca de 2 %, ou cerca de 1 % ou menos do peso seco das células. Quando uma proteína ou variante da mesma é produzida de forma recombinante pelas células hospedeiras, a proteína pode estar presente no meio de cultura em cerca de 5 g/L, cerca de 4 g/L, cerca de 3 g/L, cerca de 2 g/L, cerca de 1 g/L, cerca de 750 mg/L, cerca de 500 mg/L, cerca de 250 mg/L, cerca de 100 mg/L, cerca de 50 mg/L, cerca de 10 mg/L, ou cerca de 1 mg/L ou menos do peso seco das células. Assim, uma proteína "substancialmente purificada" pode ter um nível de pureza de pelo menos cerca de 80 %, especificamente, um nível de pureza de pelo menos cerca de 85 % e, mais especificamente, um nível de pureza de pelo menos cerca de 90 %, uma pureza nível de pelo menos cerca de 95 %, um nível de pureza de pelo menos cerca de 99 % ou mais conforme determinado por métodos apropriados, tais como análise por SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC e eletroforese capilar.

[0095] As proteínas e profármacos da presente invenção são, subsequentemente à sua preparação, preferencialmente isoladas e/ou purificadas para obter uma composição contendo uma quantidade em peso igual ou superior a 80 % ("substancialmente pura"), que é então usada ou formulada como aqui descrito. Em certas modalidades, os compostos da presente invenção são mais de 95 % puros.

[0096] Quando aqui usado, o termo "receptor" refere-se a proteínas, incluindo glicoproteínas ou fragmentos das mesmas, capazes de interagir com outra molécula, chamada de ligante. O ligante pode pertencer a qualquer classe de compostos bioquímicos ou químicos. O ligante é geralmente uma molécula extracelular que, ao se ligar ao receptor, geralmente inicia uma resposta celular, como iniciação de uma via de transdução de sinal. O receptor não precisa ser necessariamente uma proteína ligada à membrana.

[0097] Quando aqui usado, o termo "recombinante", com respeito

a uma molécula de ácido nucleico, significa um polinucleotídeo de origem genômica, cDNA, viral, semissintética e/ou sintética que, em virtude de sua origem ou manipulação, não está associado a todos ou uma porção do polinucleotídeo com o qual está associado na natureza. O termo "recombinante", quando usado em relação a uma proteína ou polipeptídeo, significa um polipeptídeo produzido pela expressão de um polinucleotídeo recombinante. O termo "recombinante", quando usado em relação a uma célula hospedeira, significa uma célula hospedeira na qual um polinucleotídeo recombinante foi introduzido.

[0098] Quando aqui usado, o termo "vírus recombinante" se refere a um vírus que é geneticamente modificado pela mão do homem. A frase cobre qualquer vírus conhecido na técnica.

[0099] Quando aqui usado, o termo "amostra" se refere a uma amostra de um ser humano, animal ou a uma amostra de pesquisa, por exemplo, uma célula, tecido, órgão, fluido, gás, aerossol, pasta, coloide ou material coagulado. A "amostra" pode ser testada *in vivo*, por exemplo, sem remoção do ser humano ou animal, ou pode ser testada *in vitro*. A amostra pode ser testada após o processamento, por exemplo, por métodos histológicos. "Amostra" também se refere, por exemplo, a uma célula que compreende uma amostra de fluido ou tecido ou uma célula separada de uma amostra de fluido ou tecido. "Amostra" também pode se referir a uma célula, tecido, órgão ou fluido que é recentemente retirado de um ser humano ou animal, ou a uma célula, tecido, órgão ou fluido que é processado ou armazenado.

[00100] Quando aqui usado, o termo "solúvel" refere-se a uma molécula de fusão, particularmente uma proteína de fusão, que não é facilmente sedimentada sob centrifugação de força G baixa (por exemplo, menos de cerca de 30.000 rotações por minuto em uma centrífuga padrão) a partir de um tampão aquoso, por exemplo, meios

celulares. Uma molécula de fusão é solúvel se permanecer em solução aquosa a uma temperatura superior a cerca de 5-37 °C e em pH neutro ou próximo a ele na presença de baixa ou nenhuma concentração de um detergente aniônico ou não iônico. Nessas condições, uma proteína solúvel frequentemente terá um baixo valor de sedimentação, por exemplo, menos do que cerca de 10 a 50 unidades de svedberg.

[00101] As soluções aquosas aqui referenciadas tipicamente possui um composto tampão para estabelecer o pH, tipicamente dentro de uma faixa de pH de cerca de 5-9, e uma faixa de força iônica entre cerca de 2 mM e 500 mM. Às vezes, um inibidor de protease ou detergente não iônico suave é adicionado. Além disso, uma proteína veículo pode ser adicionada se desejado (por exemplo, albumina de soro bovino). Tampões aquosos exemplares incluem solução salina tamponada com fosfato padrão, solução salina tamponada com tris ou outros tampões bem conhecidos e formulações de meios celulares.

[00102] Quando aqui usados, os termos "estimular" ou "estimulação" referem-se a aumentar, amplificar, engrandecer, impulsionar uma atividade fisiológica, por exemplo, uma resposta imunológica. A estimulação pode ser uma alteração positiva. Por exemplo, um aumento pode ser de 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % ou mesmo 90-100 %. Outros aumentos exemplares incluem 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 40 vezes ou mesmo 100 vezes.

[00103] Quando aqui usados, os termos "indivíduo" e "paciente" são usados indistintamente neste documento para se referir a um animal vivo (humano ou não humano). O sujeito pode ser um mamífero. Os termos "mamífero" ou "mamífero" referem-se a qualquer animal dentro da classificação taxonômica mamífera. Um mamífero pode ser um mamífero humano ou não humano, por exemplo, cães, gatos, porcos, vacas, ovelhas, cabras, cavalos, ratos e camundongos. O termo

"indivíduo" não exclui indivíduos que são inteiramente normais em relação a uma doença ou condição, ou normais em todos os aspectos.

[00104] Quando aqui usados, os termos "suprimir" ou "supressão" referem-se a diminuir, atenuar, reduzir, interromper ou estabilizar uma atividade fisiológica, por exemplo, uma resposta imunológica. A supressão pode ser uma alteração negativa. Por exemplo, uma diminuição pode ser de 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % ou mesmo 90-100 %. As diminuições exemplares incluem 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 40 vezes ou mesmo 100 vezes.

[00105] Quando aqui usado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se à dose de um agente ou agentes terapêuticos suficientes para atingir o efeito terapêutico pretendido com o mínimo ou nenhum efeito colateral indesejável. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser prontamente determinada por um médico experiente, por exemplo, administrando primeiro uma dose baixa do (s) agente (s) farmacológico (s) e, em seguida, aumentando a dose gradualmente até que o efeito terapêutico desejado seja alcançado com o mínimo ou nenhum efeito colateral indesejável.

[00106] Quando aqui usado, o termo "transfectado" significa possuir DNA ou RNA introduzidos, com ou sem o uso de quaisquer agentes facilitadores associados, como lipofectamina. Os métodos de transfecção que são conhecidos na técnica incluem, por exemplo, transfecção de fosfato de cálcio, transfecção de DEAE dextrana, fusão, eletroporação e lipofecção de protoplastos.

[00107] Quando aqui usados, os termos "tratamento" ou "tratar" de uma doença ou distúrbio referem-se a um método de redução, retardamento ou melhoria de tal condição, ou um ou mais sintomas de tal doença ou condição, antes ou depois de ter ocorrido. O tratamento pode ser direcionado a um ou mais efeitos ou sintomas de uma doença e/ou patologia subjacente. O tratamento pode ser qualquer

redução e pode ser, mas não está limitado à, ablação completa da doença ou dos sintomas da doença. Em comparação com um controle equivalente não tratado, essa redução ou grau de prevenção é de pelo menos 5 %, 10 %, 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 100 % conforme medido por qualquer técnica padrão.

[00108] Quando aqui usado, o termo "tumor" se refere a qualquer célula maligna ou neoplásica.

[00109] Quando aqui usado, o termo "vetor" se refere a uma molécula de ácido nucleico que é capaz de transmitir material genético a uma célula ou organismo hospedeiro. Um vetor pode ser composto de DNA ou RNA. Um vetor carrega sua própria origem de replicação, um ou mais sítios de reconhecimento exclusivos para endonucleases de restrição que podem ser usados para a inserção de DNA estranho e, geralmente, marcadores selecionáveis, como genes que codificam para resistência a antibióticos e, muitas vezes, sequências de reconhecimento (por exemplo, promotor) para a expressão do DNA inserido. Os vetores comuns incluem vetores plasmídicos e vetores fágicos.

[00110] Quaisquer composições ou métodos aqui descritos podem ser combinados com uma ou mais de qualquer uma das outras composições e métodos aqui fornecidos.

Descrição Detalhada da Invenção

[00111] A invenção fornece novas proteínas de fusão e suas utilizações terapêuticas. Mais particularmente, a invenção fornece novas proteínas de fusão de IL12 e seus profármacos, composições e métodos de preparação das mesmas, que são úteis no tratamento de várias doenças e distúrbios, por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética com toxicidade fora do alvo e efeitos colaterais reduzidos durante o tratamento.

[00112] Em um aspecto, a invenção geralmente se refere a uma

proteína de fusão. A proteína de fusão compreende: uma primeira unidade estrutural: uma ou duas subunidades de IL12 selecionadas de subunidades P35 e P40, em que a primeira unidade estrutural está localizada no N-terminal da proteína de fusão; uma segunda unidade estrutural: um fragmento Fc de anticorpo, em que a segunda unidade estrutural está localizada no C-terminal da proteína de fusão; e um primeiro segmento de ligação que liga covalentemente a primeira unidade estrutural e a segunda unidade estrutural ou liga covalentemente as duas subunidades da primeira unidade estrutural.

[00113] Em certas modalidades da proteína de fusão, as subunidades P35 e P40 são derivadas de um mamífero selecionado do grupo que consiste em humano, macaco, camundongo, cão, rato, vaca, porco e ovelha.

[00114] Em certas modalidades da proteína de fusão, as subunidades P35 e P40 são derivadas de humanos. Em certas modalidades da proteína de fusão, as subunidades P35 e P40 são derivadas de macaco. Em certas modalidades da proteína de fusão, as subunidades P35 e P40 são derivadas de camundongo. Em certas modalidades da proteína de fusão, as subunidades P35 e P40 são derivadas de cão. Em certas modalidades da proteína de fusão, as subunidades P35 e P40 são derivadas de um mamífero selecionado de rato. Em certas modalidades da proteína de fusão, as subunidades P35 e P40 são derivadas de vaca. Em certas modalidades da proteína de fusão, as subunidades P35 e P40 são derivadas de porco. Em certas modalidades da proteína de fusão, as subunidades P35 e P40 são derivadas de ovelhas.

[00115] Qualquer fragmento Fc de anticorpo adequado pode ser utilizado.

[00116] Em certas modalidades da proteína de fusão, o fragmento Fc do anticorpo compreende um fragmento Fc humano. Em certas

modalidades, o fragmento Fc de anticorpo compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID No. 5.

[00117] Em certas modalidades, o fragmento Fc de anticorpo compreende uma IgG1 humana. Em certas modalidades, o fragmento Fc do anticorpo compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 6.

[00118] Em certas modalidades, o IgG1 humano é *Fc-knob* humano ou *Fc-hole* humano.

[00119] Em certas modalidades, a IgG1 humana compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 7.

[00120] Em certas modalidades da proteína de fusão, a subunidade P35 de camundongo possui a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 3.

[00121] Em certas modalidades da proteína de fusão, a subunidade P35 humana possui a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 4.

[00122] Em certas modalidades da proteína de fusão, a subunidade P40 de camundongo possui a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 1.

[00123] Em certas modalidades da proteína de fusão, a subunidade P40 humana possui a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 2.

[00124] Em certas modalidades da proteína de fusão, o primeiro segmento ligante, L1, possui a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 12.

[00125] Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende ainda um peptídeo sinal, por exemplo, modificado no N-terminal da primeira unidade estrutural.

[00126] Em certas modalidades, o peptídeo sinal, SP1, modificado no N-terminal da subunidade P35 de camundongo, compreende a

sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 27.

[00127] Em certas modalidades, o peptídeo sinal, SP1, modificado no N-terminal da subunidade P35 humana, compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 28.

[00128] Em certas modalidades, o peptídeo sinal, SP2, modificado no N-terminal da subunidade P40 de camundongo, compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 29.

[00129] Em certas modalidades, o peptídeo sinal, SP2, modificado no N-terminal da subunidade P40 humana, compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 30.

[00130] Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende ainda uma porção de um receptor de interleucina 12 (IL12R), ligado covalentemente ao N-terminal da primeira unidade estrutural por um segundo segmento de ligante (L2). Em certas modalidades, o IL12R é selecionado de R β 1 e R β 2.

[00131] Em certas modalidades, o R β 1 de camundongo compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID No. 8 e o R β 2 de camundongo compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID No. 10.

[00132] Em certas modalidades, o R β 1 humano compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID No. 9 e o R β 2 humano compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID No. 11.

[00133] Em certas modalidades da proteína de fusão, o segundo segmento ligante, L2 é capaz de ser reconhecido e hidrolisado por uma enzima proteolítica expressa especificamente em um microambiente tumoral.

[00134] Em certas modalidades, a enzima proteolítica expressa especificamente no microambiente tumoral é uma metaloproteinase de matriz, por exemplo, metaloproteinase de matriz 14 (MMP14).

[00135] Em certas modalidades da proteína de fusão, o segundo segmento ligante L2 compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 13-26.

[00136] Em certas modalidades da proteína de fusão, o C-terminal do IL12R está ligado ao N-terminal da primeira unidade estrutural via L2; e o C-terminal da primeira unidade estrutural e o N-terminal da segunda unidade estrutural estão ligados pelo L1. Quando a primeira unidade estrutural compreende duas subunidades, o C-terminal da primeira subunidade e o N-terminal da segunda subunidade são ligados pelo segmento ligante L1.

[00137] Em outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma proteína homodimérica ou heterodimérica, que compreende uma proteína de fusão aqui descrita.

[00138] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um homodímero do monômero compreendendo uma subunidade P40 de camundongo, um ligante L1, uma subunidade P35 de camundongo, um ligante L1 e uma proteína de fusão de IgG1 humana, por exemplo, possuindo o conjunto de sequência de aminoácidos adiante na SEQ ID No. 31.

[00139] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um homodímero do monômero compreendendo uma subunidade P40 humana, um ligante L1, uma subunidade P35 humana, um ligante L1 e uma proteína de fusão de IgG1 humana, por exemplo, possuindo o conjunto de sequência de aminoácidos adiante na SEQ ID No. 32.

[00140] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um heterodímero de um primeiro monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P40 de camundongo, um ligante L1 e um *Fc-knob* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 33; e um

segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P35 de camundongo, um ligante L1 e um *Fc-hole* humano, por exemplo, possuindo a estrutura da sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 35.

[00141] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um heterodímero de um primeiro monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P40 humana, um ligante L1 e um *Fc-knob* humano e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 34; e um segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P35 humana, um ligante L1 e um *Fc-hole* humano, por exemplo, possuindo a estrutura da sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID No. 36.

[00142] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um homodímero do monômero: IL12R β 1 de camundongo, um ligante L2, uma subunidade P40 de camundongo, um ligante L1, uma subunidade P35 de camundongo, um ligante L1 e IgG1 humana, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 37.

[00143] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um homodímero do monômero: IL12R β 1 humano, um ligante L2, uma subunidade P40 humana, um ligante L1, uma subunidade P35 humana, um ligante L1 e IgG1 humana, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 38.

[00144] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um homodímero do monômero: IL12R β 2 de camundongo, um ligante L2, uma subunidade P40 de camundongo, um ligante L1, uma subunidade P35 de camundongo, um ligante L1 e IgG1 humana, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 39.

[00145] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um homodímero do monômero: IL12R β 2 humano, um ligante L2, uma subunidade P40 humana, um ligante L1, uma subunidade P35 humana, um ligante L1 e IgG1 humana, por exemplo, possuindo o amino sequência de ácido apresentada na SEQ ID No. 40.

[00146] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um heterodímero de um primeiro monômero: IL12R β 1 de camundongo, um ligante L2, uma subunidade P40 de camundongo, um ligante L1, uma proteína de fusão de *Fc-knob* humano, por exemplo, possuindo o conjunto de sequência de aminoácidos adiante na SEQ ID No. 41; e um segundo monômero: uma proteína de fusão de IL12R β 2 de camundongo, um ligante L2, uma subunidade P35 de camundongo, um ligante L1 e *Fc-hole* humano de IL12, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 43.

[00147] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um heterodímero de um primeiro monômero: IL12R β 1 humano, um ligante L2, uma subunidade P40 humana, um ligante L1, uma proteína de fusão de *Fc-knob* humano, por exemplo, possuindo o conjunto de sequência de aminoácidos adiante na SEQ ID No. 42; e um segundo monômero: uma proteína de fusão de IL12R β 2 humano, um ligante L2, uma subunidade P35 humana, um ligante L1 e *Fc-hole* humano de IL12, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 44.

[00148] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um heterodímero de um primeiro monômero: IL12R β 1 de camundongo, um ligante L2, uma subunidade P40 de camundongo, um ligante L1, uma proteína de fusão de um *Fc-knob* humano, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos

apresentado na SEQ ID No. 45; e um segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P35 de camundongo compreendendo um peptídeo sinal SP1, um ligante L1 e um *Fc-hole* humano, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 47.

[00149] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um heterodímero de um primeiro monômero: IL12R β 1 humano, um ligante L2, uma subunidade P40 humana, um ligante L1, uma proteína de fusão de um *Fc-knob* humano, por exemplo, possuindo o conjunto de sequência de aminoácidos adiante na SEQ ID No. 46; e um segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P35 humana compreendendo um peptídeo sinal SP1, um ligante L1 e um *Fc-hole* humano, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 48.

[00150] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um heterodímero de um primeiro monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P40 de camundongo, um ligante L1 e um *Fc-knob* humano, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No 0,49; e um segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo IL12R β 2 de camundongo, um ligante L2, uma subunidade P35 de camundongo, um ligante L1 e *Fc-hole* humano, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 51.

[00151] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é um heterodímero de um primeiro monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P40 humana, um ligante L1 e um *Fc-knob* humano, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No .50; e um segundo

monômero: uma proteína de fusão compreendendo IL12R β 2 humano, um ligante L2, uma subunidade P35 humana, um ligante L1 e *Fc-hole* humano, por exemplo, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No. 52.

[00152] Em certas modalidades, a proteína homodimérica ou heterodimérica é hidrolisada por uma enzima proteolítica expressa especificamente em um microambiente tumoral.

[00153] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma proteína substancialmente purificada, como uma proteína de fusão ou um fragmento, aqui descrito.

[00154] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a um polinucleotídeo que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento desta, aqui descrito.

[00155] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento desta, aqui descrito.

[00156] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, descrita aqui e um excipiente, veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[00157] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento desta, aqui descrita e um excipiente, veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[00158] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a um método para tratar uma doença ou condição. O método compreende a administração a um paciente em necessidade de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polinucleotídeo que codifica

uma proteína, como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrita, em que a doença ou condição é selecionada de hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética.

[00159] Em certas modalidades, a doença ou condição a ser tratada é hiperplasia.

[00160] Em certas modalidades, a doença ou condição a ser tratada é um tumor sólido.

[00161] Em certas modalidades, a doença ou condição a ser tratada é uma malignidade hematopoética.

[00162] Em certas modalidades, o sujeito a ser tratado é ainda administrado um ou mais dentre quimioterapia, radioterapia, terapia direcionada, imunoterapia ou terapia hormonal.

[00163] Em certas modalidades, o método compreende ainda a administração de um agente quimioterápico ao indivíduo.

[00164] Em certas modalidades, o método compreende ainda a administração de uma radioterapia ao indivíduo.

[00165] Em certas modalidades, o método compreende ainda a administração de uma terapia direcionada ao indivíduo.

[00166] Em certas modalidades, o método compreende ainda a administração de uma imunoterapia ao indivíduo.

[00167] Em certas modalidades, o método compreende ainda a administração de terapia hormonal ao indivíduo.

[00168] Quando aqui usado, o termo "agente quimioterapêutico" refere-se a um composto químico útil no tratamento do câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem Erlotinibe (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), Bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), Fulvestrante (FASLODEX®, AstraZeneca), Sutent (SU11248, Pfizer), Letrozol (FEMARA®, Novartis), Imatinib mesylate (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), Oxaliplatina (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracil), Leucovorina, Rapamicina

(Sirolimo, RAPAMUNE®, Wyeth), Lapatinibe (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Lonafarnibe (SCH 66336), Sorafenibe (BAY43-9006, Bayer Labs) e Gefitinibe (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tais como tiotepa e ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de nitrogênio, tais como clorambucila, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosureias, tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimnustina; antibióticos, tais como os antibióticos enedina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamall e caliqueamicina omegall (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33: 183-186); dinemicina, incluindo dinemicina A; bifosfonatos, como clodronato; bem como cromóforo de neocarzinostatina e cromóforos de antibióticos de cromoproteína enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azasserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN®

(doxorubicina), morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina e desoxidoxorubicina), epirubicina, esonibicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tais como, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabólitos, tais como, metotrexato e 5-fluorouracila (5-FU); análogos de ácido fólico, tais como, denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tais como, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamnirina, tioguanina; análogos de pirimidina, tais como, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tais como, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenais, tais como, aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, como ácido *frobnic*; aceglatona; glicosídeo aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracila; ansacrina; bestrabucila; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptínio; uma epotilona; etoglucida; nitrato de gálio; hidroxureia; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tais como, maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenameto; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etil-hidrazida; procarbazona; complexo de polissacarídeo PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente, toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por exemplo, TAXOL® (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ),

ABRAXANE® (livre de Cremophor), formulações de nanopartículas modificadas por albumina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111.), e TAXOTERE® (doxetaxel; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucila; GEMZAR® (gencitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos da platina, como cisplatina e carboplatina; vimblastina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrona; teniposídeo; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); retinoides como ácido retinoico; e sais farmaceuticamente aceitáveis, ácidos e derivados de qualquer um dos anteriores.

[00169] Exemplos do segundo (ou outro) agente ou terapia podem incluir, mas não estão limitados a, imunoterapias (por exemplo, inibidores de PD-1 (pembrolizumabe, nivolumabe, cemiplimabe), inibidores de PD-L1 (atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe), antagonistas de CTLA4 (ipilimumabe), inibidores de transdução de sinal celular (por exemplo, imatinibe, gefitinibe, bortezumibe, erlotinibe, sorafenibe, sunitinibe, dasatinibe, vorinostate, lapatinibe, tensirolimo, nilotinibe, everolimo, pazopanibe, transtuzumabe, bevacizumabe, cetuximabe, ranibizumabe, pegaptanibe, panitumumabe e similares), inibidores de mitose (por exemplo, paclitaxel, vincristina, vimblastina e similares), agentes alquilantes (por exemplo, cisplatina, ciclofosfamida, cromabucila, carmustina e similares), antimetabólitos (por exemplo, metotrexato, 5-FU e similares), agentes anticâncer intercalantes (por exemplo, actinomicina, antraciclina, bleomicina, mitomicina-C e similares), inibidores de topoisomerase (por exemplo, irinotecano, topotecano, teniposídeo e similares), agentes imunoterápicos (por exemplo, interleucina, interferon e similares) e agentes anti-hormonais (por exemplo, tamoxifeno, raloxifeno e similares).

[00170] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere ao uso de uma proteína, como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrita para o tratamento ou redução de uma doença ou distúrbio (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).

[00171] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere ao uso de um polinucleotídeo que codifica uma proteína, como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrito para o tratamento ou redução de uma doença ou distúrbio (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).

[00172] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere ao uso de uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrita e um excipiente, veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, na preparação de um medicamento para tratar ou reduzir uma doença ou distúrbio (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).

[00173] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere ao uso de um polinucleotídeo que codifica uma proteína, como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrito e um excipiente, veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, na preparação de um medicamento para tratar ou reduzir uma doença ou distúrbio (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).

[00174] Em certas modalidades, o medicamento é um fármaco anticâncer.

[00175] Em certas modalidades, a doença ou distúrbio é um ou mais selecionados de câncer de cabeça e pescoço, câncer endometrial, câncer colorretal, câncer de ovário, câncer de mama, melanoma, câncer de pulmão, câncer renal, câncer de fígado, câncer anal, sarcoma, linfoma, leucemia, tumores cerebrais, câncer gástrico,

câncer testicular, câncer pancreático e câncer de tireoide.

[00176] Em certas modalidades, o medicamento anticâncer é eficaz para o tratamento de linfoma de células B ou câncer anticolorretal.

[00177] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma linhagem celular compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento desta, aqui descrita.

[00178] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a um método para preparar uma proteína, compreendendo a cultura da linhagem celular. Em certas modalidades, o método compreende ainda purificar ou isolar uma proteína produzida, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrito.

[00179] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a um método para preparar uma proteína. O método compreende: fornecer um vetor de expressão que codifica uma proteína, tal como uma proteína de fusão ou um fragmento da mesma, aqui descrito; introdução do vetor de expressão em uma célula hospedeira; cultivar a célula hospedeira em meio sob condições suficientes para expressar a proteína; e purificar a proteína da célula ou meio hospedeiro.

[00180] Quaisquer vetores de expressão adequados podem ser utilizados. Um exemplo de vetor de expressão é o vetor de expressão pEE12.4.

[00181] Qualquer célula hospedeira adequada pode ser empregada, por exemplo, células 293F e CHO.

[00182] A introdução do vetor de expressão pode ser realizada por qualquer método de transfecção adequado e pode ser via uma transfecção transitória ou uma linhagem celular estável.

[00183] Qualquer método de purificação adequado pode ser utilizado. Um método de purificação exemplar é por cromatografia de afinidade de Proteína A/G ou métodos de exclusão por tamanho.

[00184] Em ainda outro aspecto, a invenção geralmente se refere a uma proteína isolada produzida por um método aqui descrito.

[00185] Em certas modalidades, a proteína isolada é substancialmente pura.

[00186] Conforme aqui descrito, as sequências de ligação podem ser usadas para ligar dois ou mais polipeptídeos do polipeptídeo biologicamente ativo para gerar uma molécula de cadeia única com uma atividade funcional desejada.

Quaisquer ligantes adequados podem ser adotados. Sequências ligantes de peptídeo exemplares incluem aquelas possuindo de cerca de 7 a 20 aminoácidos, por exemplo, de cerca de 8 a 16 aminoácidos. A sequência de ligação é de preferência flexível de modo a não reter o polipeptídeo biologicamente ativo ou a molécula efetora em uma única conformação indesejada. A sequência de ligante pode ser usada, por exemplo, para espaçar o sítio de reconhecimento da molécula fundida. Especificamente, a sequência de ligante de peptídeo pode ser posicionada de modo a fornecer flexibilidade molecular. O ligante preferivelmente compreende predominantemente os aminoácidos com pequenas cadeias laterais, tais como glicina, alanina e serina, para fornecer flexibilidade.

[00187] Em geral, a preparação dos complexos de proteína de fusão da invenção pode ser realizada por procedimentos aqui descritos e por técnicas de DNA recombinante reconhecidas envolvendo, por exemplo, reações de amplificação da cadeia de polimerase (PCR), preparação de DNA de plasmídeo, clivagem de DNA com enzimas de restrição, preparação de oligonucleotídeos, ligação de DNA, isolamento de mRNA, introdução do DNA em uma célula adequada, transformação ou transfecção de um hospedeiro, cultura do hospedeiro. Além disso, as moléculas de fusão podem ser isoladas e purificadas usando agentes caotrópicos e métodos

eletroforéticos, de centrifugação e cromatográficos bem conhecidos. (Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. (1989); e Ausubel, *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989) para descrição relacionada a esses métodos.)

[00188] A invenção fornece ainda sequências de ácido nucleico e sequências de DNA que codificam as presentes proteínas de fusão. A sequência de DNA pode ser transportada por um vetor adequado para replicação extracromossômica, tal como um fago, vírus, plasmídeo, fagomídeo, cosmídeo, YAC ou epissoma. Por exemplo, um vetor de DNA que codifica uma proteína de fusão desejada pode ser usado para facilitar os métodos preparativos aqui descritos e para obter quantidades significativas da proteína de fusão ou seus componentes. A sequência de DNA pode ser inserida em um vetor de expressão apropriado, isto é, um vetor que contém os elementos necessários para a transcrição e translação da sequência de codificação da proteína inserida. Uma variedade de sistemas hospedeiro-vetor pode ser utilizada para expressar a sequência de codificação de proteína. Estes podem incluir sistemas de células de mamíferos infectados com vírus (por exemplo, vírus da vacínia, adenovírus, etc.); sistemas de células de insetos infectados com vírus (por exemplo, baculovírus); micro-organismos, tal como levedura contendo vetores de levedura ou bactérias transformadas com DNA de bacteriófago, DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo. Dependendo do sistema hospedeiro-vetor utilizado, qualquer um dentre vários elementos de transcrição e translação adequados pode ser usado. (Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. (1989); e Ausubel, *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989) para descrição relacionada a esses métodos.)

[00189] Os componentes da proteína de fusão codificados pelo

vetor de DNA podem ser fornecidos em formato de cassete. Pelo termo "cassete" entende-se que cada componente pode ser facilmente substituído por outro componente por métodos recombinantes padrão. Em particular, um vetor de DNA configurado em um formato de cassete é particularmente desejável quando o complexo de fusão codificado é para ser usado contra patógenos que podem ter ou ter capacidade para desenvolver sorotipos.

[00190] Para fazer o vetor que codifica para um complexo da proteína de fusão, a sequência que codifica para o polipeptídeo biologicamente ativo está ligada a uma sequência que codifica para o peptídeo efetor por uso de ligases adequadas. O DNA que codifica para o peptídeo de apresentação pode ser obtido isolando o DNA de fontes naturais, tais como de uma linhagem celular adequada ou por métodos sintéticos conhecidos, por exemplo, o método do triéster de fosfato. (Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, M. J. Gait, ed., 1984). Os oligonucleotídeos sintéticos também podem ser preparados usando sintetizadores de oligonucleotídeos automatizados comercialmente disponíveis. Uma vez isolado, o gene que codifica para o polipeptídeo biologicamente ativo pode ser amplificado por PCR ou outros meios conhecidos na técnica. Iniciadores de PCR adequados para amplificar o gene do polipeptídeo biologicamente ativo podem adicionar sítios de restrição ao produto de PCR. O produto de PCR inclui preferivelmente sítios de ligação para o peptídeo efetor e sequências líder necessárias para a expressão e secreção adequadas do complexo de fusão de polipeptídeo-efetor biologicamente ativo. O produto de PCR também inclui preferivelmente uma sequência que codifica para a sequência de ligante, ou um sítio de enzima de restrição para a ligação de uma tal sequência.

[00191] As proteínas de fusão aqui descritas podem ser produzidas por técnicas de DNA recombinante padrão. Por exemplo, uma vez que

uma molécula de DNA que codifica o polipeptídeo biologicamente ativo é isolada, a sequência pode ser ligada a outra molécula de DNA que codifica o polipeptídeo efetor. A sequência de nucleotídeos que codifica para um polipeptídeo biologicamente ativo pode ser diretamente ligada a uma sequência de DNA que codifica para o peptídeo efetor ou, mais tipicamente, uma sequência de DNA que codifica para a sequência de ligante como aqui discutido pode ser interposta entre a sequência que codifica para o polipeptídeo biologicamente ativo e a sequência que codifica para o peptídeo efetor e ligada usando ligases adequadas. A molécula de DNA híbrido resultante pode ser expressa em uma célula hospedeira adequada para produzir o complexo da proteína de fusão. As moléculas de DNA são ligadas umas às outras em uma orientação de 5' a 3' de modo que, após a ligação, a estrutura translacional dos polipeptídeos codificados não seja alterada (isto é, as moléculas de DNA são ligadas entre si na estrutura). As moléculas de DNA resultantes codificam uma proteína de fusão na estrutura.

[00192] Outras sequências de nucleotídeos também podem ser incluídas no construto do gene. Por exemplo, uma sequência promotora, que controla a expressão da sequência que codifica para o polipeptídeo biologicamente ativo fundido ao peptídeo efetor, ou uma sequência líder, que direciona a proteína de fusão para a superfície celular ou o meio de cultura, pode ser incluída no construto ou presente no vetor de expressão no qual o construto é inserido.

[00193] Na obtenção das sequências de codificação de domínio de polipeptídeo biologicamente ativo variante, IL12, IL12R ou Fc, aqueles versados na técnica reconhecerão que os polipeptídeos podem ser modificados por certas substituições de aminoácidos, adições, deleções e modificações pós-translacionais, sem perda ou redução da atividade biológica. Em particular, é bem conhecido que as

substituições conservativas de aminoácidos, isto é, a substituição de um aminoácido por outro aminoácido de tamanho, carga, polaridade e conformação semelhantes, são improváveis de alterar significativamente a função da proteína. Os 20 aminoácidos padrão que são os constituintes das proteínas podem ser amplamente categorizados em quatro grupos de aminoácidos conservadores como segue: o grupo não polar (hidrofóbico) inclui alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano e valina; o grupo polar (sem carga, neutro) inclui asparagina, cisteína, glutamina, glicina, serina, treonina e tirosina; o grupo carregado positivamente (básico) contém arginina, histidina e lisina; e o grupo carregado negativamente (ácido) contém ácido aspártico e ácido glutâmico. É improvável que a substituição em uma proteína de um aminoácido por outro dentro do mesmo grupo tenha um efeito adverso na atividade biológica da proteína. Em outro caso, modificações nas posições dos aminoácidos podem ser feitas para reduzir ou realçar a atividade biológica da proteína. Tais mudanças podem ser introduzidas randomizadamente ou por meio de mutações específicas do sítio com base em propriedades estruturais ou funcionais conhecidas ou presumidas de resíduo(s) direcionado(s). Após a expressão da proteína variante, as mudanças na atividade biológica devido à modificação podem ser facilmente avaliadas usando ensaios de ligação ou funcionais.

[00194] A homologia entre as sequências de nucleotídeos pode ser determinada por análise de hibridização de DNA, em que a estabilidade do híbrido de DNA de fita dupla depende da extensão do pareamento de bases que ocorre. Condições de alta temperatura e/ou baixo teor de sal reduzem a estabilidade do híbrido e podem ser variadas para evitar o recozimento de sequências possuindo menos do que um grau selecionado de homologia. Por exemplo, para sequências com cerca de 55 % de teor de GC, as condições de hibridização e

lavagem de 40-50 C, 6*SSC (tampão de cloreto de sódio/citrato de sódio) e SDS a 0,1 % (dodecil sulfato de sódio) indicam cerca de 60-70 % de homologia, as condições de hibridização e lavagem de 50-65 C, 1*SSC e SDS a 0,1 % indicam cerca de 82-97 % de homologia, e as condições de hibridização e lavagem de 52 C, 0.5SSC e SDS a 0,1 % indicam cerca de 99-100 % de homologia. Uma ampla faixa de programas de computador para comparar sequências de nucleotídeos e aminoácidos (e medir o grau de homologia) também está disponível. A comparação de sequências prontamente disponíveis e os algoritmos de alinhamento de múltiplas sequências são, respectivamente, a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) e os programas ClustalW.

[00195] Uma série de estratégias podem ser utilizadas para expressar os complexos de fusão de proteínas da invenção. Por exemplo, o construto da proteína de fusão descrita acima pode ser incorporada em um vetor adequado por meios conhecidos, tais como pelo uso de enzimas de restrição para fazer cortes no vetor para inserção do construto seguido por ligação. O vetor contendo o construto do gene é, então, introduzido em um hospedeiro adequado para a expressão da proteína de fusão. (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. (1989) para a descrição relacionada a esses métodos.)

[00196] A seleção de vetores adequados pode ser feita empiricamente com base em fatores relacionados ao protocolo de clonagem. Por exemplo, o vetor deve ser compatível e ter o réplicon apropriado para o hospedeiro que está sendo utilizado. Além disso, o vetor deve ser capaz de acomodar a sequência de DNA que codifica para o complexo da proteína de fusão que deve ser expresso. As células hospedeiras adequadas incluem células eucarióticas e procarióticas, preferivelmente aquelas células que podem ser facilmente transformadas e exibem crescimento rápido em meio de

cultura. Especificamente, as células hospedeiras preferidas incluem procariotas, tais como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc. e eucariotas, tais como células animais e cepas de levedura, por exemplo, *S. cerevisiae*. As células de mamífero são geralmente preferidas, particularmente J558, NSO, SP2-O ou CHO. Outros hospedeiros adequados incluem, por exemplo, células de inseto, como Sf9. Condições de cultivo convencionais são utilizadas. Veja Sambrook, supra. As linhagens celulares estáveis transformadas ou transfectadas podem, então, ser selecionadas. As células que expressam um complexo da proteína de fusão da invenção podem ser determinadas por procedimentos conhecidos. Por exemplo, a expressão de um complexo da proteína de fusão ligado a uma imunoglobulina pode ser determinada por um ELISA específico para a imunoglobulina ligada e/ou por imunoblotting. Outros métodos para detectar a expressão das proteínas de fusão compreendendo polipeptídeos biologicamente ativos ligados a domínios IL12 ou IL12R são descritos nos Exemplos.

[00197] Uma célula hospedeira pode ser usada para fins preparativos para propagar ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão desejada ou um componente desta. Uma célula hospedeira pode incluir uma célula procariótica ou eucariótica em que a produção da proteína de fusão é especificamente pretendida. Assim, as células hospedeiras incluem especificamente levedura, mosca, verme, planta, rã, células de mamíferos e órgãos que são capazes de propagar o ácido nucleico que codifica a fusão. Exemplos não limitativos de linhagens celulares de mamíferos que podem ser utilizadas incluem células CHO dhfr (Urlaub e Chasm, **1980** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216), células 293 (Graham *et al.* **1977** *J. Gen. Virol.*, 36:59 ()) ou células de mieloma como SP2 ou NSO (Galfre e Milstein, **1981** *Meth. Enzymol.*, 73(B):3).

[00198] As células hospedeiras capazes de propagar o ácido

nucleico que codifica os complexos da proteína de fusão desejados também abrangem células eucarióticas de não mamíferos, incluindo inseto (por exemplo, *Sp. frugiperda*), levedura (por exemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *K. lactis*, *H. polymorpha*; como geralmente revisto por Fleer, R., **1992** *Current Opinion in Biotechnology*, 3(5):486-496), células fúngicas e vegetais. Também contemplados estão certos procariontes, como *E. coli* e *Bacillus*.

[00199] O ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão desejada pode ser introduzido em uma célula hospedeira por técnicas padrão para transfectar células. O termo "transfectar" ou "transfecção" destina-se a abranger todas as técnicas convencionais para a introdução de ácido nucleico em células hospedeiras, incluindo coprecipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrano, lipofecção, eletroporação, microinjeção, transdução viral e/ou integração.

[00200] Vários promotores (região reguladora de iniciação da transcrição) podem ser usados de acordo com a invenção. A seleção do promotor apropriado depende do hospedeiro de expressão proposto. Promotores de fontes heterólogas podem ser usados, desde que sejam funcionais no hospedeiro escolhido.

[00201] A seleção do promotor também depende da eficiência desejada e do nível de produção de peptídeo ou proteína. Promotores induzíveis, tal como *tac* são frequentemente utilizados para aumentar drasticamente o nível de expressão da proteína em *E. coli*. A superexpressão de proteínas pode ser prejudicial às células hospedeiras. Consequentemente, o crescimento da célula hospedeira pode ser limitado. O uso de sistemas promotores induzíveis permite que as células hospedeiras sejam cultivadas até densidades aceitáveis antes da indução da expressão do gene, facilitando assim rendimentos mais elevados do produto.

[00202] Várias sequências de sinal podem ser usadas de acordo com a invenção. Uma sequência de sinal que é homóloga à sequência de codificação do polipeptídeo biologicamente ativo pode ser utilizada. Alternativamente, uma sequência de sinal que foi selecionada ou projetada para secreção e processamento eficientes no hospedeiro de expressão também pode ser usada. Uma sequência de sinal pode ser unida diretamente através da sequência que codifica o sítio de clivagem da peptidase de sinal para a sequência de codificação da proteína, ou através de uma ponte de nucleotídeo curta.

[00203] A construto de expressão pode ser montada empregando técnicas conhecidas de DNA recombinante. A digestão com enzimas de restrição e a ligação são as etapas básicas utilizadas para unir dois fragmentos de DNA. Poliligantes e adaptadores podem ser utilizados para facilitar a união de fragmentos selecionados. A construto de expressão pode tipicamente ser montada em estágios empregando ciclos de restrição, ligação e transformação de *E. coli*. Numerosos vetores de clonagem adequados para a construção do construto de expressão são conhecidos na técnica (λ ZAP e pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, Calif., PET, Novagen Inc., Madison, Wis.).

[00204] O construto de expressão pode ser transformado no hospedeiro como o construto de vetor de clonagem, linear ou circular, ou pode ser removido do vetor de clonagem e usado como está ou introduzido em um vetor de liberação. O vetor de liberação facilita a introdução e manutenção do construto de expressão no tipo de célula hospedeira selecionado. O construto de expressão é introduzido nas células hospedeiras por qualquer um de uma série de sistemas de transferência de genes conhecidos (por exemplo, competência natural, transformação quimicamente mediada, transformação de protoplastos, eletroporação, transformação biolística, transfecção ou conjugação). O sistema de transferência de genes selecionado depende das células

hospedeiras e dos sistemas de vetores usados.

[00205] A presente invenção fornece ainda um processo de produção para isolar uma proteína de fusão de interesse. No processo, uma célula hospedeira (por exemplo, uma levedura, fungo, inseto, célula bacteriana ou animal), na qual foi introduzido um ácido nucleico que codifica a proteína de interesse operacionalmente ligada a uma sequência reguladora, é cultivada em escala de produção em um meio de cultura para estimular a transcrição da sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de fusão de interesse. Subsequentemente, a proteína de fusão de interesse é isolada das células hospedeiras colhidas ou do meio de cultura. Técnicas de purificação de proteína padrão podem ser usadas para isolar a proteína de interesse do meio ou das células colhidas. Em particular, as técnicas de purificação podem ser usadas para expressar e purificar uma proteína de fusão desejada em grande escala (ou seja, em pelo menos quantidades de miligramas) a partir de uma variedade de implementações, incluindo frascos rotativos, frascos giratórios, placas de cultura de tecidos, biorreator ou um fermentador.

[00206] Um complexo de fusão de proteína expresso pode ser isolado e purificado por métodos conhecidos. Tipicamente, o meio de cultura é centrifugado ou filtrado e, em seguida, o sobrenadante é purificado por cromatografia de afinidade ou imunoafinidade, por exemplo, cromatografia de afinidade de Proteína-A ou Proteína-G ou um protocolo de imunoafinidade compreendendo o uso de anticorpos monoclonais que se ligam ao complexo de fusão expresso, tal como um TCR ligado ou sua região de imunoglobulina. As proteínas de fusão da presente invenção podem ser separadas e purificadas por combinação apropriada de técnicas conhecidas. Estes métodos incluem, por exemplo, métodos que utilizam solubilidade, como precipitação de sal e precipitação de solvente, métodos que utilizam a

diferença no peso molecular, como diálise, ultrafiltração, filtração em gel e eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, métodos que utilizam uma diferença na carga elétrica, como cromatografia de coluna de troca iônica, métodos que utilizam afinidade específica, como cromatografia de afinidade, métodos que utilizam uma diferença na hidrofobicidade, como cromatografia líquida de alta performance de fase reversa e métodos que utilizam uma diferença no ponto isoelétrico, como eletroforese de foco isoelétrico, colunas de afinidade de metal como Ni-NTA. (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. (1989); e Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989) para descrição relacionada a esses métodos.)

[00207] É preferido que as proteínas de fusão da presente invenção sejam substancialmente puras. Ou seja, as proteínas de fusão foram isoladas de substituintes celulares que as acompanham naturalmente, de modo que as proteínas de fusão estejam presentes preferivelmente em pelo menos 80 % ou 90 % a 95 % de homogeneidade (p/p). As proteínas de fusão com pelo menos 98 a 99 % de homogeneidade (p/p) são as mais preferidas para muitas aplicações farmacêuticas, clínicas e de pesquisa. Uma vez substancialmente purificada, a proteína de fusão deve estar substancialmente livre de contaminantes para aplicações terapêuticas. Uma vez purificadas parcialmente ou com pureza substancial, as proteínas de fusão solúveis podem ser usadas terapeuticamente, ou na realização de ensaios *in vitro* ou *in vivo*, como aqui descrito. A pureza substancial pode ser determinada por uma variedade de técnicas padrão, como cromatografia e eletroforese em gel.

[00208] A invenção também fornece uma preparação farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição, uma proteína de fusão, um polinucleotídeo, um construto

de gene, um vetor ou uma célula hospedeira de acordo com a invenção e um excipiente ou veículo farmacêuticamente aceitável.

[00209] Os excipientes preferidos para utilização na presente invenção incluem açúcares, amidos, celulosas, gomas e proteínas. Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica da invenção é formulada em uma forma farmacêutica para administração como um sólido (por exemplo, comprimidos, cápsulas, pastilhas, grânulos, supositórios, sólidos estéreis cristalinos ou amorfos que podem ser reconstituídos para fornecer formas líquidas, *etc.*), líquido (por exemplo, soluções, suspensões, emulsões, elixires, loções, unguentos, *etc.*) ou semissólidos (géis, unguentos, cremes e semelhantes). As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas por qualquer rotina, incluindo, sem limitação, rotina oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutânea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual ou retal. Uma revisão das diferentes formas de administração de princípios ativos, os excipientes a serem usados e seus procedimentos de fabricação podem ser encontrados em Remington's Pharmaceutical Sciences (AR Gennaro, Ed.), 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA (2000). Exemplos de veículos farmacêuticamente aceitáveis são conhecidos no estado da técnica e incluem soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões, tais como emulsões de óleo/água, diferentes tipos de agentes umidificantes, soluções estéreis, *etc.* As composições compreendendo os referidos veículos podem ser formuladas por procedimentos convencionais conhecidos no estado da técnica.

[00210] No caso da composição farmacêutica da invenção compreendendo ácidos nucleicos (os polinucleotídeos da invenção, vetores ou construtos de genes), a invenção contempla composições farmacêuticas especialmente preparadas para a administração dos

referidos ácidos nucleicos. As composições farmacêuticas podem compreender os referidos ácidos nucleicos na forma nua, em outras palavras, na ausência de compostos que protejam os ácidos nucleicos da degradação pelas nucleases do organismo, o que traz a vantagem de eliminar a toxicidade associada aos reagentes usados para transfecção. As rotinas de administração adequadas para os compostos nus incluem as rotinas intravascular, intratumoral, intracraniana, intraperitoneal, intraplênica, intramuscular, sub-retinal, subcutânea, mucosa, tópica e oral (Templeton, **2002** *DNA Cell Biol.*, 21: 857-867). Alternativamente, os ácidos nucleicos podem ser administrados formando parte dos lipossomas, conjugados com colesterol ou conjugados com compostos capazes de promover a translocação através das membranas celulares, como o peptídeo Tat derivado da proteína TAT de EEV-1, a terceira hélice do homeodomínio do Proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, a proteína VP22 do vírus do herpes simples, oligômeros de arginina e peptídeos como os descritos em WO07069090 (Lindgren, *et al.* **2000** *Trends Pharmacol. Sci* 21:99-103; Schwarze, *et al.* **2000** *Trends Pharmacol. Sci.* 21:45-48; Lundberg, *et al.* **2003** *Mol. Therapy* 8:143-150; e Snyder, *et al.* **2004** *Pharm. Res.* 21:389-393). Alternativamente, o polinucleotídeo pode ser administrado formando parte de um vetor plasmídico ou de um vetor viral, preferivelmente vetores baseados em um adenovírus, em vírus adenoassociado ou em retrovírus, tais como vírus baseados no vírus da leucemia murina (MLV) ou em lentivírus (HIV, FIV, EIAV).

[00211] As composições da invenção podem ser administradas em doses inferiores a 10 mg por quilograma de peso corporal, preferivelmente inferior a 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 ou 0,00001 mg por cada kg de peso corporal e menos de 200 nmol de agente, em outras palavras,

aproximadamente $4,4 \times 10^{16}$ cópias por kg de peso corporal ou menos de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15 ou 0,075 nmol por Kg de peso corporal. A dose unitária pode ser administrada por injeção, por inalação ou por administração tópica. Os polinucleotídeos bifuncionais e composições da invenção podem ser administrados diretamente no órgão em que o mRNA alvo é expresso, caso em que as doses serão administradas dentre 0,00001 mg e 3 mg por órgão, ou preferivelmente entre 0,0001 e 0,001 mg por órgão, cerca de 0,03 e 3,0 mg por órgão, cerca de 0,1 e 3,0 mg por órgão ou entre 0,3 e 3,0 mg por órgão.

[00212] A dose dependerá da gravidade e da resposta à condição a ser tratada e pode variar entre vários dias e vários meses ou até que a condição remeta. A dose ideal pode ser determinada medindo periodicamente as concentrações do agente no organismo do paciente. A dose ideal pode ser determinada a partir dos valores de EC50 obtidos em testes anteriores *in vitro* ou *in vivo* em modelos animais. A dose unitária pode ser administrada uma vez por dia ou menos de uma vez por dia, preferivelmente, menos de uma vez a cada 2, 4, 8 ou 30 dias. Alternativamente, é possível administrar uma dose inicial seguida de uma ou várias doses de manutenção, geralmente em uma quantidade menor que a dose inicial. O regime de manutenção pode envolver o tratamento do paciente com doses variando entre 0,01 µg e 1,4 mg/kg de peso corporal por dia, por exemplo 1, 0,1, 0,01, 0,001 ou 0,00001 mg por kg de peso corporal por dia. As doses de manutenção são administradas, preferivelmente, no máximo uma vez a cada 5, 10 ou 30 dias. O tratamento deve continuar por um tempo que irá variar de acordo com o tipo de alteração sofrida pelo paciente, sua gravidade e o estado do paciente. Após o tratamento, a evolução do paciente deve ser monitorada para determinar se a dose deve ser aumentada no caso da doença não responder ao tratamento ou se a

dose deve ser diminuída caso seja observada melhora da doença ou efeitos secundários indesejáveis.

[00213] A dose diária pode ser administrada em dose única ou em duas ou mais doses de acordo com as circunstâncias particulares. Se for necessária uma administração repetida ou administrações frequentes, é aconselhável implantar um dispositivo de administração, como uma bomba, um cateter semipermanente (intravenoso, intraperitoneal, intracisternal ou intracapsular) ou um reservatório.

[00214] As composições da invenção são administradas de acordo com métodos conhecidos por um especialista na técnica, incluindo, sem limitação, intravenosa, oral, nasal, parenteral, tópica, transdérmica, retal e semelhantes.

[00215] Os exemplos seguintes pretendem ser ilustrativos da prática da invenção e não limitativos de qualquer forma.

Exemplos

[00216] Os exemplos abaixo descrevem certas modalidades exemplares de compostos preparados de acordo com a invenção descrita. Será apreciado que os seguintes métodos gerais, e outros métodos conhecidos por alguém versado na técnica, podem ser aplicados a compostos e subclasses e espécies dos mesmos, conforme descrito aqui.

Exemplo 1. Projeto de sete profármacos de IL12-Fc

[00217] IL12 possui duas subunidades, p35 e p40. O segmento Fc de IgG1 humano, *Fc-knob* humano e *Fc-hole* humano foram usados para construir os profármacos correspondentes. O projeto do profármaco liga as duas subunidades de IL12 em série ou paralelo. As formas específicas são as seguintes:

[00218] **FIGURA 1** é um esquema que mostra a estrutura do Homodímero-IL12-Fc (Homo IL12), em que duas subunidades estão ligadas em série e o peso molecular do dímero é 175 KD (PM = 175 KD).

[00219] **FIGURA 2** é um diagrama esquemático que mostra a estrutura de Heterodímero-IF12-Fc (Het IF12), em que duas subunidades estão ligadas em paralelo. O peso molecular do dímero é 115KD (PM = 115KD), e um peptídeo de sinal P35 e um peptídeo de sinal P40 foram adicionados no N-terminal das subunidades P35 e P40, respectivamente.

[00220] As formas de profármaco bloqueiam IF 12 da ligação a qualquer um dos seus receptores ou bloqueiam simultaneamente a ligação a ambos os receptores, IL12R β 1 e IL12R.p2. Uma porção do domínio extracelular de IL12R β 1, compreendida por dois domínios de Fibronectina tipo III (I+II) no N-terminal de IL12R β 1 e referido como R β 1, é fundida ao N-terminal de P40. R β 1 serve como uma isca impedindo competitivamente a interação endógena de IL12R β 1 com P40. P35 é bloqueado usando os dois domínios de Fibronectina tipo III (I+II) no N-terminal de IL12R β 2, referido como R β 2, evitando assim a interação de P35 com IL12R β 2 endógeno.

[00221] O construto de profármaco para o Homodímero-IL12 é mostrado na **FIGURA 3**.

[00222] **FIGURA 3** é um diagrama esquemático da estrutura do profármaco do Homodímero-IL12-R{S11 (referido como Homo-R1), PM do dímero = 232 KD.

[00223] **FIGURA 4** é um diagrama esquemático da estrutura de profármaco de Homodímero-IL12-Rp2 (referido como Homo-R2), PM do dímero = 250KD.

[00224] **FIGURA 5** é um diagrama esquemático da estrutura do profármaco do Heterodímero-IL12-Rp1/Rp2 (referido como Het-R1/R2), PM do dímero = 182KD.

[00225] **FIGURA 6** é um diagrama esquemático da estrutura do profármaco de Heterodímero-IL12-Rp1 (referido como Het-R1), PM do dímero = 144 KD e o peptídeo de sinal P35 foi adicionado ao C-

terminal do segmento de fusão P35 do monômero de Fc-*hole* P35 neste dímero.

[00226] **FIGURA 7** é um diagrama esquemático da estrutura de profármaco de Heterodímero-IL12-Rp2 (referido como Het-R2), PM do dímero = 153 KD, e o peptídeo de sinal P40 foi adicionado ao C-terminal do segmento de fusão P40 do monômero do Fc-*knob* P40 neste dímero.

Exemplo 2. Construção, purificação e produção de profármaco de IL12

[00227] As sete proteínas descritas no Exemplo 1 foram expressas e produzidas. Primeiro, o DNA recombinante para cada proteína de fusão, construído no vetor de expressão pEE12.4, foi transfectado em células 293F ou CHO. As células hospedeiras foram cultivadas e o sobrenadante celular foi coletado. Em seguida, a proteína foi purificada do sobrenadante por cromatografia de coluna de afinidade de Proteína A/G.

[00228] Para a expressão de proteínas de homodímero, os plasmídeos do vetor de expressão construídos foram transferidos para os hospedeiros de células 293 ou CHO. Os produtos de expressão de plasmídeo na célula podem formar espontaneamente uma proteína homodimérica. Para a expressão da proteína do heterodímero, foi necessário transfectar com dois plasmídeos de vetor de expressão com a mesma relação molar, e o monômero expresso na célula também pode formar espontaneamente o heterodímero.

[00229] O resultado da eletroforese de SDS-PAGE é mostrado na **FIGURA 8**.

[00230] Os procedimentos utilizados para a construção do vetor, transfecção de células hospedeiras e indução da expressão são discutidos abaixo.

[00231] Os plasmídeos de expressão de várias proteínas de fusão

foram construídos no vetor de PEE12.4 e transfectados em células 293F ou CHO. As proteínas expressas no sobrenadante da cultura foram purificadas por cromatografia de coluna de afinidade com Proteína A.

[00232] Os vetores de expressão foram construídos da seguinte forma:

[00233] (1) PEE 12.4-HindIII-p40(signal)-Nrul-p35(sem sinal)-BsiWI-hlgG1-EcoRI

[00234] (2) PEE 12.4-HindIII-P35(signal)-BsiWI-Fch-EcoRI

[00235] (3) PEE 12.4-HindIII-P40(signal)-Nrul-Fck-EcoRI

[00236] (4) PEE 12.4-HindIII-IL12Rb1-BsiWI-p40(sem sinal)-Nrul-p35(sem sinal)-BsiWI-hlgG1-EcoRI

[00237] (5) PEE 12.4-HindIII-IL12Rb2-BsiWI-p40(sem sinal)-Nrul-p35 (sem sinal)-BsiWI-hlgG1-EcoRI

[00238] (6) PEE 12.4-HindIII-IL12Rb1-BsiWI-p40(sem sinal)-Nrul-Fck-EcoRI

[00239] (7) PEE 12.4-HindIII-IL12Rb2-BstBI-p35(sem sinal)-BsiWI-Fch-EcoRI

[00240] HindIII, Nrul, BsiWI, e EcoRI são sítios de clivagem de enzima.

[00241] As sequências de ligação entre cada segmento de proteína de fusão são:

[00242] (1) Homo IL12: Ligante L1 entre P40 e P35, Ligante L1 entre P35 e Fc.

[00243] (2) Het IL12: Ligante L1 entre P40 e Fc, Ligante L1 entre P35 e Fc.

[00244] (3) Ligante L2 entre R β 1 e P40; a sequência alvo correspondente da protease é SGRSENIRTA.

[00245] (4) Ligante L2 entre R β 2 e P40; a sequência alvo da protease correspondente é SGRSENIRTA.

[00246] (5) Ligante L2 entre R β 2 e P35; a sequência alvo correspondente da protease é SGRSENIRTA.

[00247] A transfecção pode ser feita de forma estável ou transitória, o protocolo de transfecção transitória foi:

[00248] (1) Ressuscitação celular: as células Freestyle 293F foram criopreservadas em meios CD OptiCHOTM (contendo DMSO a 10 %) em uma concentração de 3×10^7 células/mL. Após retirada do nitrogênio líquido, foi rapidamente dissolvido em banho-maria a 37 °C, e adicionado a um tubo de centrifuga de 15 mL contendo 10 mL de meios OptiCHOTM, centrifugado em 1.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e a pélete celular foi suspensa e cultivada em 30 ml de meios OptiCHOTM a 37 °C, CO₂ a 8 %, 135 rpm. Após 4 dias, as células foram expandidas e cultivadas, e a concentração não foi superior a 3×10^6 células/mL quando expandidas.

[00249] (2) Dois dias antes da transfecção, as células 293F preparadas para cultura em suspensão foram utilizadas para transfecção transitória (200 ml) a uma densidade de sementeira de $0,6-0,8 \times 10^6$ células/mL.

[00250] (3) Dois dias depois, a suspensão de células transfectadas foi contada (densidade celular esperada em $2,5-3,5 \times 10^6$ células/mL) e a suspensão de células foi centrifugada a 1.000 rpm por 5 min, e o sobrenadante foi descartado.

[00251] (4) As células foram ressuspensas em 50 mL de meios Freestyle 293 frescos, centrifugadas novamente a 1.000 rpm por 5 min, e o sobrenadante foi descartado.

[00252] (5) Ressuspender as células 293F com 200 mL de meios Freestyle 293.

[00253] (6) 600 μ g do plasmídeo foram diluídos com 5 mL de meios Freestyle 293 e esterilizados por filtração usando um filtro de 0,22 μ M.

[00254] (7) 1,8 mg de PEI foi diluído com 5 mL de meios Freestyle 293 e esterilizado por filtração usando um filtro de 0,22 µM. Imediatamente, 5 mL do plasmídeo e 5 mL de PEI foram misturados e deixados repousar em temperatura ambiente por 5 min.

[00255] (8) A mistura de plasmídeo/PEI foi adicionada à suspensão de células, colocada em uma incubadora a 37 °C, CO₂ a 8 %, 85 rpm e suplementada com um fator de crescimento de 50 pg/L de LONGTM R3 IGF-1.

[00256] (9) Após 4 horas, 200 ml de meios EX-CELLTM 293 e Glutamina 2 mM foram adicionados, e a velocidade foi ajustada para 135 rpm para continuar a cultura.

[00257] (10) Após 24 horas, o inibidor de proliferação celular 3,8 mM VPA foi adicionado. O sobrenadante foi coletado entre 4-8 dias após a transfecção (para a qualidade ideal da proteína, confirmar que a taxa de sobrevivência celular é superior a 70 % no momento da coleta).

[00258] Coleta, purificação e verificação de eletroforese da proteína de fusão:

[00259] (1) Preparação da amostra: A solução de cultura de células em suspensão foi transferida para um cilindro de centrifuga de 500 mL e centrifugada a 8.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e as impurezas foram removidas usando um filtro de 0,45 µM. NaN₃ a 0,05 % foi adicionado para prevenir o crescimento de bactérias durante o processo de purificação.

[00260] (2) Montagem da coluna: A quantidade apropriada de agarose de Proteína A foi adicionada à coluna (20 mg da proteína de fusão Fc humana por 1 mL de proteína A) e incubada à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos com solução de etanol a 20 %. A saída da coluna foi aberta para descarregar lentamente a solução de etanol por gravidade.

[00261] (3) A coluna foi lavada e equilibrada com 10 volumes de coluna de água destilada e Tampão de Ligação (fosfato de sódio a 20 mM + NaCl 0,15 M, pH 7,0), respectivamente.

[00262] (4) A amostra foi constantemente bombeada através da coluna a uma taxa de fluxo de 10 volumes de coluna por hora.

[00263] (5) As colunas foram lavadas com 10 vezes o volume da coluna do Tampão de Ligação e enxaguadas até que o efluente não tenha detecção de proteína.

[00264] (6) Tampão de Eluição (glicina 0,1 M, pH 2,7) foi usado para a eluição e o eluído foi coletado em incrementos de 1 mL. Uma quantidade apropriada de Tris 1 M, pH 9,0 foi adicionada para neutralizar (o pH foi ajustado para 6-8, e o ponto isoelétrico da proteína purificada deve ser 0,5 ou mais).

[00265] (7) A solução da proteína alvo foi substituída pelo tampão desejado usando uma coluna de rotação dessalinizadora Zeba ou uma coluna de rotação concentrada (o pH do tampão é ajustado para evitar o ponto isoelétrico da proteína). Usando BSA como UM padrão, a concentração de proteína foi determinada por eletroforese SDS-PAGE (2,5 µg de carga de proteína por amostra) e NanoDrop2000.

[00266] Após a eluição, a coluna foi lavada sucessivamente com 20 volumes de coluna de água destilada e, em seguida, a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de etanol a 20 %. Finalmente, a solução de etanol foi imersa no meio de gel e armazenada a 4 °C.

Exemplo 3. Atividade Antitumoral In vivo de Proteínas de Fusão

[00267] A injeção sistêmica de IL12-Fc elimina completamente tumores MC38, e Het IL12 é mais potente do que Homo IL12

[00268] Para determinar se IL12-Fc foi capaz de limpar efetivamente tumores durante a administração sistêmica e comparar os efeitos terapêuticos de ambas as formas de IL12-Fc, o modelo de

camundongo MC38 foi usado em camundongos e coortes foram tratados em diferentes doses por administração sistêmica. Os resultados do teste são mostrados na FIGURA 9.

[00269] FIGURA 9A: Camundongos WT C57BL/6 (n = 5/grupo) foram inoculados por via subcutânea com 5×10^5 células MC38 no dia 0. O volume do tumor de camundongos com tumor foi registrado por injeção intraperitoneal de PBS, 0,5 pg, 1 pg, 5 pg, 10 pg de Homo IL12 nos dias 13, 16 e 20.

[00270] FIGURA 9B: Camundongos WT C57BL/6 (n = 5/grupo) foram inoculados por via subcutânea com 5×10^5 células MC38 no dia 0. O volume do tumor de camundongos com tumor foi registrado por injeção intraperitoneal de PBS, 0,5 pg, 1 pg, 5 pg, 10 pg de Het IL12 nos dias 13, 16 e 20.

[00271] Estes resultados indicam que IL12-Fc foi eficaz na eliminação de tumores e que Het IL12 é mais potente do que Homo IL12.

O uso sistêmico de IL12-Fc causa efeitos colaterais graves e Het IL12 é mais tóxico do que Homo IL12

[00272] Uma vez que os receptores de IL12 estão amplamente presentes nas células T, B e NK, o uso de IL12 é frequentemente acompanhado por fortes efeitos colaterais tóxicos. Clinicamente, os pacientes são caracterizados principalmente por várias doenças do sangue e toxicidade hepática. Várias citocinas inflamatórias no soro de camundongo foram medidas experimentalmente como um indicador primário de toxicidade causada por IL12-Fc.

[00273] Camundongos WT C57BL/6 (n = 5/grupo) foram inoculados subcutaneamente com 5×10^5 células MC38 no dia 0; injeção intraperitoneal de PBS nos dias 13, 16 e 20, 5 µg de Homo IL12 ou Het IL12. 6 horas após a administração no 20º dia, o sangue foi coletado da veia ocular para detectar os níveis de fatores inflamatórios IL12p70,

IFN- γ , TNF, MCP-1, IL-10 e IL-6 no soro.

[00274] Como um resultado, como mostrado na **FIGURA 10**, tanto Homo IL12 quanto Het IL12 causaram forte citotoxicidade, e Het IL12 foi mais citotóxico do que Homo IL12.

Profármacos do receptor Het IL12 elimina o tumor MC38 de forma eficaz

[00275] Os profármacos de IL12 foram construídos ligando os receptores iscas de IL12 usando uma sequência de substrato sensível a certas enzimas proteolíticas para castrar a isca de IL12 no microambiente tumoral. A enzima proteolítica capaz de clivar o substrato é mais altamente expressa em certos tipos de tumor em comparação com o tecido normal, portanto, a localização de IL12 ativa no sítio do tumor é aumentada enquanto a toxicidade sistêmica de IL12 é diminuída. Em experimentos *in vivo*, quando a quantidade usada foi inferior a 5 pg/camundongo, o Het IL12 apresentou um efeito antitumoral mais forte em tumores MC38 do que Homo IL12 e também foi mais tóxico. Para testar o conceito de profármaco como meio de reduzir a toxicidade da terapia de IL12 *in vivo*, Het IL12 (descrito no Exemplo 1) foi ligado a um receptor de IL12 isca em várias configurações (por exemplo, Het-R1, Het-R2, Het-R1/R2). Homo IL12 ligado a um receptor de IL12 isca (por exemplo, Homo-R1, Homo-R2), também foi testado.

[00276] **FIGURA 11A:** Camundongos WT C57BL/6 (n = 5/grupo) foram inoculados por via subcutânea com 5×10^5 células MC38 no dia 0 e 5 pg de Het IL12, Het-R1, Het-R2 ou Het-R1/R2 no dia 10, 13, e 16, o grupo controle foi tratado com PBS.

[00277] **FIGURA 11B:** Camundongos WT C57BL/6 (n = 5/grupo) foram inoculados por via subcutânea com 5×10^5 células MC38 no dia 0. Nos dias 10, 13 e 16, injeção intraperitoneal de 2,5 μ g de Het IL12, Het-R1, Het-R2, ou Het-R1/R2, e o grupo controle foi tratado com

PBS.

[00278] Os resultados mostraram que as três formas de profármaco de Het IL12 foram eficazes na eliminação de tumores. A uma dose de 5 pg/camundongo, as três formas de profármacos de Het IL12 possui um efeito antitumor melhor em MC38 do que Homo IL12 e, quando a dose é reduzida para 2,5 pg/camundongo, a profármaco de Het IL12 (Het R1, Het R2 ou Het -R1/R2) ainda pode controlar efetivamente o tumor.

Os profármacos de Het IL12 ligado ao receptor de IL12 possui menos efeitos colaterais quando administrados sistemicamente

[00279] Alterações de peso corporal de camundongos foram registradas após a administração sistêmica de diferentes fármacos/profármacos e o nível de expressão de citocinas inflamatórias no soro também foi coletado da veia ocular de camundongos.

[00280] **FIGURA 12A:** Camundongos WT C57BL/6 (n = 5/grupo) foram inoculados por via subcutânea com 5×10^5 células MC38 no dia 0 e 2,5 ug de Het IL12, Het-R1, Het-R2, Het-R1/R2 nos dias 10, 13 e 16, o grupo controle era PBS. O peso dos camundongos foi medido enquanto sendo tratado.

[00281] **FIGURA 12B-G:** O sangue foi retirado da veia do olho do camundongo enquanto sendo tratado. Os níveis séricos das citocinas inflamatórias IL12p70, TNF, IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6 foram medidos.

[00282] Os resultados mostraram que Het IL12 ligado ao profármaco do receptor de IL12 (Het-R1, Het-R2) possui menos efeitos colaterais tóxicos do que Het IL12 não ligado ao receptor de IL12 a uma dose de 2,5 pg/camundongo, e Het-R2 foi menos tóxico do que outros tipos de profármaco.

[00283] Em resumo, no modelo MC38 de camundongo, o profármaco de IL12-Fc ligado ao receptor de IL12 mantém a eficácia

antitumoral e aumenta a segurança de IL12-Fc. A dose baixa (2,5 µg) do profármaco de Het IL12 ligado ao receptor de IL12 eliminou completamente os tumores MC38 com um volume tumoral de 130-150 mm³ e o tumor não recidivou. Em comparação com a mesma dose de IL12-Fc que não estava ligada ao receptor de IL12, o primeiro (profármaco de Het IL12-Fc ligado ao receptor de IL12) produziu menos toxicidade durante a injeção sistêmica, o que se refletiu na perda de peso significativamente reduzida e níveis mais baixos de citocinas inflamatórias no sangue. Het-R2, em particular, era o construto mais seguro.

[00284] Versões humanas análogas de várias proteínas de fusão de IL15 e profármacos aqui descritos também foram produzidas e testadas *in vitro*. A produção de proteína humana seguiu o mesmo protocolo de clonagem, transfecção e purificação descrito anteriormente.

[00285] Os resultados da eletroforese SDS-PAGE das proteínas de fusão humanas purificadas incubadas com ou sem MMP14 a 37 °C por 24 horas são mostrados na **FIGURA 13**.

[00286] A funcionalidade de Het-R1 e Het-R1/R2 humanos foi medida usando o ensaio de linhagem de células repórter de IL12 HEK-Blue™ (Invivogen). As células de IL-12 HEK-Blue™ são projetadas para detectar **IL-12 humana bioativa** pela expressão de um gene repórter SEAP induzível por STAT4. A ligação de IL-12 à IL-12R na superfície das células de IL-12 HEK-Blue™ desencadeia uma cascata de sinalização levando à ativação de STAT-4 com a produção subsequente de SEAP. A ativação das células de IL-12 HEK-Blue™ foi medida usando QUANTI-Blue™ para detectar SEAP no sobrenadante celular.

[00287] O seguinte ensaio de linhagem celular repórter de células de IL-12 HEK-Blue™ foi usado:

[00288] (1) Células de IL-12 HEK-Blue™ foram cuidadosamente enxaguadas em PBS e suspensas em meio de teste fresco, pré-aquecido (DMEM, 4,5 g/l de glicose, L-glutamina 2 mM, PBS inativado por calor a 10 % (v/v) (30 min a 56 °C em ~1 x 10⁶ células/ml.

[00289] (2) As amostras foram diluídas em série em uma placa de 96 cavidades de fundo plano e incubadas em uma incubadora de CO₂ com 50 µl de suspensão de células (~ 50.000 células) por cavidade a 37 °C por 20-24 horas.

[00290] (3) Incubar 20 µL de sobrenadante de células HEK-Blue™ IL-12 induzido por cavidade de uma placa de 96 cavidades de fundo plano com 100 µL de Solução QUANTI-Blue™ ressuspensa por cavidade em uma incubadora de 37°C por 15 min a 1 hora.

[00291] (4) Determinar os níveis de SEAP usando um espectrofotômetro em 650 nm.

[00292] **Resultado: FIGURA 14A** mostra que a atividade de IL12 do profármaco Het-R1 após a digestão de MMP14 é comparável ou maior do que Het IL12. Em contraste, Het-R1 sem digestão com MMP14 é menos ativo, indicando que o mecanismo de bloqueio do profármaco funciona conforme o esperado. **FIGURA 14B** mostra que a atividade do profármaco Het-R1/R2 após a digestão de MMP14 é comparável a Het IL12 e IL12 recombinante. Em contraste, Het-R1/R2 sem digestão com MMP14 é menos ativo, indicando que o mecanismo de bloqueio do profármaco funciona como o esperado.

Listagem de SEQ

SEQ ID No.1: subunidade P40 de camundongo (sem peptídeo de sinal)

MWELEKDVYV	VEVDWTPDAP	GETVNLTCDT	PEEDDITWTS
DQRHGVIGSG	KTLTITVKEF		
LDAGQYTCHK	GGETLSHSHL	LLHKKENGIW	STEILKNFKN

KTFLKCEAPN YSGRFTCSWL
 VQRNMDLKFN IKSSSSSPDS RAVTCGMASL SAEKVTLDQR
 DYEKYSVSCQ EDVTCPTAEE
 TLPIELALEA RQQNKYENYS TSFFIRDIK PDPPKNLQMK
 PLKNSQVEVS WEYPDSWSTP
 HSYFSLKFFV RIQRKKEKMK ETEEGCNQKG AFLVEKTSTE
 VQCKGGNVCV QAQDRYYNSS
 CSKWACVPCR VRS

SEQ ID No. 2: subunidade P40 humana (sem peptídeo de sinal)

WELKKDVYVVELDWPDPAGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVL
 GSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDIL
 KDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD
 PQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEV
 MVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY
 PDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNAS
 ISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

SEQ ID No. 3: subunidade P35 de camundongo (sem peptídeo de sinal)

RVIPVSGPAR CLSQSRNLLK TTDDMVKTAR EKLKHYSCTA
 EDIDHEDITR DQTSTLKTCL
 PLELHKNESE LATRETSSTT RGSCLPQKT SLMMTLCLGS
 IYEDLKMYQT EFQAINAALQ
 NHNHQQIILD KGMLVAIDEL MQSLNHNGET LRQKPPVGEA
 DPYRVKMKLC ILLHAFSTRV
 VTINRVMGYL SSA

SEQ ID No. 4: subunidade P35 humana (sem peptídeo de sinal)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEI
 DHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSF
 MMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL
 MQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSY

LNAS

SEQ ID No. 5: *Fc-hole* humano

DKTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT
CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD		
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA	PIEKTISKAK		
GQPREPQVCT	LPPSRDELTK	NQVSLSCAVK	GFYPSDIAVE
WESNGQPENN	YKTTTPVLDS		
DGSFFLVSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS
LSLSPGK			

SEQ ID No. 6: *Fc-knob* humano

DKTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT
CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD		
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA	PIEKTISKAK		
GQPREPQVYT	LPPCRDELTK	NQVSLWCLVK	GFYPSDIAVE
WESNGQPENN	YKTTTPVLDS		
DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS
LSLSPGK			

SEQ ID No. 7: *Fc* humano de IgG1

DKTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDQ	LMISRTPEVT
CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD		
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA	PIEKTISKAK		
GQPREPQVYT	LPPSRDELTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE
WESNGQPENN	YKTTTPVLDS		
DGSFLYSKLT	VDKSRWQQGN	VFSCSVLHEA	LHNHYTQKSL
SLSPGK			

SEQ ID No. 8: *I β* de camundongo

MDMMGLAGTS	KHITFLLLCQ	LGASGPGDGC	CVEKTSFPEG
------------	------------	------------	------------

ASGSPLGPRN LSCYRVSKTD
 YECWQYDGP EDNVSHVLWC CFVPPNHTHT GQERCRYFSS
 GPDRTVQFWE QDGIPVLSKV
 NFWVESRLGN RTMKSQKISQ YLYNWTKTTP PLGHIKVSQS
 HRQLRMDWNV SEEAGAEVQF
 RRRMPTTNWT LGDCGPQVNS GSGVLGDIRG SMSESCLCPS
 ENMAQEIQIR RRRRLSSGAP
 GGPWSDWSMP VCVPPPEVLP

SEQ ID No. 9: R β 1 humano

MEPLVTWVPLLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDADSGSASG
 PRDLRCYRISSDRYECWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAG
 SATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVK
 YEPPLGDIKVSCLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTSPSPWKLG
 DCGPQDDDTESCLCPLMNVAQEFQLRRRRRLGSQGSSWSKWSSPV
 CVPPEN

SEQ ID No. 10: R β 2 de camundongo

MAQTVRECSL ALLFLFMWLL IKANIDVCKL GTVTVQPAPV
 IPLGSAANIS CSLNPKQGCS
 HYPSSNELIL LKFVNDVLVE NLHGKKVHDH TGHSSTFQVT
 NLSLGMTLFV CKLNCSNSQK
 KPPVPVCGVE ISVGVAPEPP QNISCVQEGE NGTVACSWNS
 GKVTYLKTNY TLQLSGPNNL
 TCQKQCFSDN RQNCNRLDLG INLSPDLAES RFIVRVTAI
 DLGNSSSLPH TFTFLDIVIP
 LPPWDIRINF LNASGSRGTL QWEDEGQVVL NQLRYQPLNS
 TSWNMVNATN AKGKYDLRDL
 RPFTEYEFQI SSKLHLSSGGS WSNWSESLRT RTPEEEEP

SEQ ID No. 11: R β 2 humano

MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNIT
 CSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTL

FVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPSEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWE
 RGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPE
 SNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRC
 TLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTAKGRHDLLDLKPFT
 EYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEP

SEQ ID No. 12: segmento de ligante L1

GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID No. 13: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGARYRWLTAGGGGS

SEQ ID No.14: segmento de ligante L2

GGGGSSGRSENIRTAGGGGS

SEQ ID No. 15: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGRAMHMYTAGGGGS

SEQ ID No. 16: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGAAMHMYTAGGGGS

SEQ ID No. 17: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGAIGFLRTAGGGGS

SEQ ID No. 18: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGASENIRTAGGGGS

SEQ ID No. 19: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGRPENIRTAGGGGS

SEQ ID No. 20: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGAPENIRTAGGGGS

SEQ ID No. 21: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGLISHSITAGGGGS

SEQ ID No. 22: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGNLRSKLTAGGGGS

SEQ ID No. 23: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGVFSIPLTAGGGGS

SEQ ID No. 24: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGIKYHSLTAGGGGS

SEQ ID No. 25: segmento de ligante L2 (MMP14)

SEQ ID No. 26: segmento de ligante L2 (MMP14)

GGGGSSGRIGFLRTAGGGGS

SEQ ID No. 27: peptídeo de sinal P35 de camundongo SP1

MCQSRYLLFL ATLALLNHLS LA

SEQ ID No. 28: peptídeo de sinal P35 humano SP1

MCPARSLLLVATLVLLDHLSLA

SEQ ID No. 29: peptide de sinal P40 de camundongo SP2

MCPQKLTISW FAIVLLVSPL MA

SEQ ID No. 30: peptídeo de sinal P40 humano SP2

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAI

SEQ ID No. 31: Homo IL-12 de camundongo

MCPQKLTISW FAIVLLVSPL MAMWELEKDV YVVEVDWTPD

APGETVNLTC DTPEEDDITW

TSDQRHGVIG SGKTLTITVK EFLDAGQYTC HKGGETLSHS

HLLLHKKENG IWSTEILKNF

KNKTFLKCEA PNYSGRFTCS WLVQRNMDLK FNIKSSSSSP

DSRAVTCGMA SLSAEKVTLD

QRDYEKYSVS CQEDVTCPTA EETLPIELAL EARQQNKYEN

YSTSFFIRDI IKPDPPKNLQ

MKPLKNSQVE VSWEYPDSWS TPHSYFSLKF FVRIQRKKEK

MKETEEGCNQ KGAFLEKTS

TEVQCKGGNV CVQAQDRYYN SSCSKWACVP CRVRSGGGGS

GGGGSGGGGS RVIPVSGPAR

CLSQSRNLLK TTDDMVKTAR EKLKHYSCTA EDIDHEDITR

DQTSTLKTCL PLELHKNESE

LATRETSSTT RGSCLPQKT SLMMTLCLGS IYEDLKMYQT

EFQAINAALQ NHNHQQIILD

KGMLVAIDEL MQSLNHNGET LRQKPPVGEA DPYRVKMKLC

ILLHAFSTRV VTINRVMGYL
 SSAGGGGSGG GSGGGGSDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL
 FPPKPKDQLM ISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ
 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFLYSKLTVD KSRWQQGNVF
 SCSVLHEALH NHYTQKSLSL
 SPGK

SEQ ID No. 32: Homo IL12 humana

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVV
 LTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG
 EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC
 WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYE
 YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPD
 PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKR
 EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSG
 GGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVSNML
 QKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSR
 ETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD
 PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCI
 LLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 33: subunidade 1 de Het IL-12 de camundongo

MCPQKLTISW FAIVLLVSPL MAMWELEKDV YVVEVDWTPD

APGETVNLTC DTPEEDDITW
 TSDQRHGVIG SGKTLTITVK EFLDAGQYTC HKGGETLSHS
 HLLLHKKENG IWSTEILKNF
 KNKTFLKCEA PNYSGRFTCS WLVQRNMDLK FNIKSSSSSP
 DSRVTCGMA SLSAEKVTLD
 QRDYEKYSVS CQEDVTCPTA EETLPIELAL EARQQNKYEN
 YSTSFFIRDI IKPDPPKNLQ
 MKPLKNSQVE VSWEYPDSWS TPHSYFSLKF FVRIQRKKEK
 MKETEEGCNQ KGAFLVEKTS
 TEVQCKGGNV CVQAQDRYYN SSCSKWACVP CRVRSGGGGS
 GGGSGGGGS DKTHTCPPCP
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPCRDELTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

SEQ ID No. 34: subunidade 1 de Het IL12 humana

MCHQQLVISWFSVLFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVV
 LTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG
 EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC
 WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYE
 YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPD
 PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKR
 EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSG
 GGGSGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

YKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 35: subunidade 2 de Het IL12 de camundongo

MCQSRYLFL ATLALLNHLS LARVIPVSGP ARCLSQSRNL
LKTDDMVKT AREKLKHYSC
TAEDIDHEDI TRDQTSTLKT CLPLELHKNE SCLATRETSS
TTRGSCLPQ KTSMMTLCL
GSIEDLKMY QTEFQAINAA LQNHNHQQII LDKGMLVAID
ELMQSLNHNG ETLRQKPPVG
EADPYRVKMK LCILLHAFST RVVTINRVMG YLSSAGGGGS
GGGGSGGGGS DKTHTCPPCP
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVCT
LPPSRDELTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL
TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

SEQ ID No. 36: subunidade 2 de Het IL12 humana

MCPARSLLLVATLVLLDHLNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRA
VSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNES
CLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMN
AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFY
KTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGGSGGGGSDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQ
VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 37: Homo-R1 de camundongo

MDMMGLAGTS	KHITFLLLCQ	LGASGPGDGC	CVEKTSFPEG
ASGSPLGPRN	LSCYRVSKTD		
YECSWQYDGP	EDNVSHVLWC	CFVPPNHTHT	GQERCRYFSS
GPDRTVQFWE	QDGIPVLSKV		
NFWVESRLGN	RTMKSQKISQ	YLYNWTKTTP	PLGHIKVSQS
HRQLRMDWNV	SEEAGAEVQF		
RRRMPTTNWT	LGDCGPQVNS	GSGVLGDIRG	SMSESCLCPS
ENMAQEIQIR	RRRRLSSGAP		
GGPWSDWSMP	VCVPPEVLPG	GGGSSGRSEN	IRTAGGGGSM
WELEKDVYVV	EVDWTPDAPG		
ETVNLTCDTP	EEDDITWTSD	QRHGVIGSGK	TLTITVKEFL
DAGQYTCHKG	GETLSHSHLL		
LHKKENGIWS	TEILKNFKNK	TFLKCEAPNY	SGRFTCSWL
QRNMDLKFNI	KSSSSSPDSR		
AVTCGMASLS	AEKVTLDQRD	YEKYSVSCQE	DVTCPTAEET
LPIELALEAR	QQNKYENYST		
SFFIRDIKP	DPPKNLQMKP	LKNSQVEVSW	EYPDSWSTPH
SYFSLKFFVR	IQRKKEKMKE		
TEEGCNQKGA	FLVEKTSTEV	QCKGGNVCVQ	AQDRYYNSSC
SKWACVPCR	RVSGGGGSGGG		
GSGGGGSRVI	PVSGPARCLS	QSRNLLKTTD	DMVKTAREKL
KHYSCTAEDI	DHEDITRDQT		
STLKTCLPLE	LHKNESCLAT	RETSSTTRGS	CLPPQKTSLM
MTLCLGSIYE	DLKMYQTEFQ		
AINAALQNH	HQQIILDKGM	LVAIDELMQS	LNHNGETLRQ
KPPVGEADPY	RVKMKLCILL		
HAFSTRVVTI	NRVMGYLSSA	GGGGSGGGGS	GGGGSDKTHT
CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP		
KPKDQLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH
NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV		

LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL
 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS
 VLHEALHNHY TQKSLSLSPG K

SEQ ID No. 38: Homo-R1 humano

MEPLVTWVVPLLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDADSGSASG
 PRDLRCYRISSDRYECWSQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAG
 SATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVK
 YEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTSPSPWKLG
 DCGPQDDDTESCLCPLMNVAQEFQLRRRRLGSQGSSWSKWSSPV
 CVPPENGGGGSSGRSENIRTAGGGGGSWELKKDVYVVELDWYPDAP
 GEMVVLTCDTPEEDGITWTLTQSSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT
 CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNY
 SGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGR
 DNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFI
 RDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ
 VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
 ASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNL
 RAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKN
 ESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTM
 NAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF
 YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSD
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 39: Homo-R2 de camundongo

MAQTVRECSL ALLFLFMWLL IKANIDVCKL GTVTVQPAPV

IPLGSAANIS CSLNPKQGCS
 HYPSSNELIL LKFVNDVLVE NLHGKKVHDH TGHSTTFQVT
 NLSLGMTLFV CKLNCSNSQK
 KPPVPVCGVE ISVGVAPEPP QNISCVQEGE NGTVACSWNS
 GKVTYLKTNY TLQLSGPNNL
 TCQKQCFSDN RQNCNRLDLG INLSPDLAES RFIVRVTAİN
 DLGNSSSLPH TFTFLDIVIP
 LPPWDIRINF LNASGSRGTL QWEDEGQVVL NQLRYQPLNS
 TSWNMVNATN AKGKYDLRDL
 RPFTEYEFQI SSKLHLSSGS WSNWSESLRT RTPEEEPGGG
 GSSGRSENIR TAGGGGSMWE
 LEKDVYVVEV DWTPDAPGET VNLTCDTPEE DDITWTSDQR
 HGVIGSGKTL TITVKEFLDA
 GQYTCHKGGE TLSHSHLLLH KKENGIWSTE ILKNFKNKTF
 LKCEAPNYSG RFTCSWLVR
 NMDLKFNİKS SSSSPDSRAV TCGMASLSAE KVTLDQRDYE
 KYSVSCQEDV TCPTAEETLP
 IELALEARQQ NKYENYSTSF FIRDİIKPDP PKNLQMKPLK
 NSQVEVSWEY PDSWSTPHSY
 FSLKFFVRIQ RKKEKMKETE EGCNQKGAFL VEKTSTEVQC
 KGGNVCVQAQ DRYYNSSCSK
 WACVPCRVRŞ GGGGSGGGGS GGGGSRVIPV SGPARCLSQS
 RNLLKTDDM VKTAREKLKH
 YSCTAEDİDH EDITRDQTST LKTCLPLELH KNESCLATRE
 TSSTTRGSCL PPQKTSMMT
 LCLGSIYEDL KMYQTEFQAI NAALQNHNHQ QİILDKGMLV
 AIDELMQSLN HNGETLRQKP
 PVGEADPYRV KMKLCİLLHA FSTRVVTİNR VMGYLSSAGG
 GGSGGGGSGG GGSDKTHTCP
 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDQLMİSRTP EVTCVVVDVS

HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
ENNYKTTTPPV LDSDGSFLYS
KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVL HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

SEQ ID No. 40: Homo-R2 humano

MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNIT
CSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTL
FVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWE
RGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPE
SNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSR
TLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMNVNVTAKGRHDLLDLKPFT
EYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPPGGGGSSGRSENIR
TAGGGGGSWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL
DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSSHLLLLHKKE
GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVK
SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPA
EESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ
VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT
VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGG
SRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSE
EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKT
SFMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID
ELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVM
SYLNASGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEA

LHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 41: subunidade 1 de Het-R1/R2 de camundongo

MDMMGLAGTS	KHITFLLLCQ	LGASGPGDGC	CVEKTSFPEG
ASGSPLGPRN LSCYRVSKTD			
YECWQYDGP	EDNVSHVLWC	CFVPPNHTHT	GQERCRYFSS
GPDRTVQFWE QDGIPVLSKV			
NFWVESRLGN	RTMKSQKISQ	YLYNWTKTTP	PLGHIKVSQS
HRQLRMDWNV SEEAGAEVQF			
RRRMPTTNWT	LGDCGPQVNS	GSGVLGDIRG	SMSESCLCPS
ENMAQEIQIR RRRRLSSGAP			
GGPWSWWSMP	VCVPPEVLPG	GGGSSGRSEN	IRTAGGGGSM
WELEKDVYVV EVDWTPDAPG			
ETVNLTCDTP	EEDDITWTSD	QRHGVIGSGK	TLTITVKEFL
DAGQYTCHKG GETLSHSHLL			
LHKKENGIWS	TEILKNFKNK	TFLKCEAPNY	SGRFTCSWLW
QRNMDLKFNI KSSSSSPDSR			
AVTCGMASLS	AEKVTLDQRD	YEKYSVSCQE	DVTCPTAEET
LPIELALEAR QQNKYENYST			
SFFIRDIIP	DPPKNLQMKP	LKNSQVEVSW	EYPDSWSTPH
SYFSLKFFVR IQRKKEKMKE			
TEEGCNQKGA	FLVEKTSTEV	QCKGGNVCVQ	AQDRYYNSSC
SKWACVPCRVRSGGGGSGGG			
GSGGGGSDKT	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI
SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV			
KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW
LNGKEYKCKV SNKALPAIE			
KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	CRDELTKNQV	SLWCLVKGFY
PSDIAVEWES NGQPENNYKT			
TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH
NHYTQKSLSL SPGK			

SEQ ID No. 42: subunidade 1 de Het-R1/R2 humana

MEPLVTWVVP LLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDADSGSASG
 PRDLRCYRISSDRYEC SWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAG
 SATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVK
 YEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTSPSPWKLG
 DCGPQDDDTESCLCPLMNVAQEFQLRRRRLGSQGSSWSKWSSPV
 CVPPENGGGGSSGRSENIRTAGGGGGSWELKKDVYVVELDWYPDAP
 GEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT
 CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNY
 SGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV RG
 DNKEYEYSVEQCQEDSACPA AEESLP I EVMVDAVHKLKYENYTSSFFI
 RDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ
 VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
 ASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 43: subunidade 2 de Het-R1/R2 de camundongo

MAQTVRECSL ALLFLFMWLL IKANIDVCKL GTVTVQPAPV
 IPLGSAANIS CSLNPKQGCS
 HYPSSNELIL LKFVNDVLVE NLHGKKVHDH TGHSSSTFQVT
 NLSLGMTLFV CKLNCSNSQK
 KPPVPVCGVE ISVGVAPEPP QNISCVQEGE NGTVACSWNS
 GKVTYLKTN Y TLQLSGPNNL
 TCQKQCFSDN RQNCNRLDLG INLSPDLAES RFIVRV TAIN
 DLGNSSSLPH TFTFLDIVIP
 LPPWDIRINF LNASGSRGTL QWEDEGQVVL NQLRYQPLNS
 TSWNMVNATN AKGKYDLRDL

RPFTEYEFQI SSKLHLSSGS WSNWSESLRT RTPEEEEPGGG
 GSSGRSENIR TAGGGGSRVI
 PVSGPARCLS QSRNLLKTTD DMVKTAREKL KHYSCTAEDI
 DHEDITRDQT STLKTCLPLE
 LHKNESCLAT RETSSTTRGS CLPPQKTSML MTLCLGSIYE
 DLKMYQTEFQ AINAALQNH
 HQQIILDKGM LVAIDELMQS LNHNGETLRQ KPPVGEADPY
 RVKMKLCILL HAFSTRVVTI
 NRVMGYLSSA GGGGSGGGGS GGGGSDKTHT CPPCPAPELL
 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR
 DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTHP PVLDSGGSFF LVSKLTVDKS
 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH
 YTQKSLSLSP GK

SEQ ID No. 44: subunidade 2 de Het-R1/R2 humana

mahtfrgcslafmfiitwllikaKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQ
 GCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLAC
 INSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHL
 YTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDGFINLTPESPESNFTAKVT
 AVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDE
 GLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISS
 KLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPPGGGGSSGRSENIRTAGGGGS
 RNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVSNNMLQKARQTLEFYPTCTSEEI
 DHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSF
 MMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL
 MQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSY
 LNASGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK

PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 45: subunidade 1 de Het-R1 de camundongo

MDMMGLAGTS KHITFLLLCQ LGASGPGDGC CVEKTSFPEG
 ASGSPLGPRN LSCYRVSKTD
 YECSWQYDGP EDNVSHVLWC CFVPPNHTHT GQERCRYFSS
 GPDRTVQFWE QDGIPVLSKV
 NFWVESRLGN RTMKSQKISQ YLYNWTKTTP PLGHIKVSQS
 HRQLRMDWNV SEEAGAEVQF
 RRRMPTTNWT LGDCGPQVNS GSGVLGDIRG SMSESCLCPS
 ENMAQEIQIR RRRRLSSGAP
 GGPWSDWSMP VCVPEVLPG GGGSSGRSEN IRTAGGGGSM
 WELEKDVYVV EVDWTPDAPG
 ETVNLTCDTP EEDDITWTSD QRHGVIGSGK TLTITVKEFL
 DAGQYTCHKG GETLSHSHLL
 LHKKENGIEWS TEILKNFKNK TFLKCEAPNY SGRFTCSWL
 VQRNMDLKFNI KSSSSSPDSR
 AVTCGMASLS AEKVTLDQRD YEKYSVSCQE DVTCPAEET
 LPIELALEAR QQNKYENYST
 SFFIRDIKP DPPKNLQMKP LKNSQVEVSW EYPDSWSTPH
 SYFSLKFFVR IQRKKEKMKE
 TEEGCNQKGA FLVEKTSTEV QCKGGNVCVQ AQDRYYNSSC
 SKWACVPCRVRSGGGGGSGGG
 GSGGGGSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIE

KTISKAKGQP REPQVYTLPP CRDELTKNQV SLWCLVKGFY
 PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
 NHYTQKSLSL SPGK

SEQ ID No. 46: subunidade 1 de Het-R1 humana

MEPLVTWVVPLLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDADSGSASG
 PRDLRCYRISSDRYECWSQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAG
 SATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVK
 YEPPLGDIKVSCLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTSPSPWKLG
 DCGPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRRLGSQGSSWSKWSSPV
 CVPPENGSGGGSSGRSENIRTAGGGGGSWELKKDVYVVELDWYPDAP
 GEMVLTCDTPEEDGITWTLTDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT
 CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNY
 SGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRG
 DNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFI
 RDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ
 VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
 ASVPCSGGGGGSGGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 47: subunidade 2 de Het-R1 de camundongo

MCQSRYLLFL ATLALLNHLS LARVIPVSGP ARCLSQSRNL
 LKTTDDMVKT AREKLKHYS
 TAEDIDHEDI TRDQTSTLKT CLPLELHKNE SCLATRETSS
 TTRGSCLPPQ KTSLLMMTLCL
 GSIYEDLKMY QTEFQAINAA LQNHNHQQII LDKGMLVAID
 ELMQSLNHNG ETLRQKPPVG

EADPYRVKMK LCILLHAFST RVVTINRVMG YLSSAGGGGS
 GGGGSGGGGS DKTHTCPPCP
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVCT
 LPPSRDELTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
 YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

SEQ ID No. 48: subunidade 2 de Het-R1 humana

MCPARSLLLVATLVLLDHLNLPVATPDPMFCLHHSQNLLRA
 VSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNES
 CLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMN
 AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFY
 KTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQ
 VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 49: subunidade 1 de Het-R2 de camundongo

MCPQKLTISW FAIVLLVSPL MAMWELEKDV YVVEVDWTPD
 APGETVNLTC DTPEEDDITW
 TSDQRHGVIG SGKTLTITVK EFLDAGQYTC HKGGETLSHS
 HLLLHKKENG ISTEILKNF
 KNKTFLKCEA PNYSGRFTCS WLVQRNMDLK FNIKSSSSSP
 DSRVTCGMA SLSAEKVTLT
 QRDYEKYSVS CQEDVTCPTA EETLPIELAL EARQQNKYEN
 YSTSFFIRDI IKPDPPKNLQ
 MKPLKNSQVE VSWEYPDSWS TPHYFSLKF FVRIQRKKEK

MKETEEGCNQ KGAFLEKTS
 TEVQCKGGNV CVQAQDRYYN SSCSKWACVP CRVRSGGGGS
 GGGSGGGGS DKTHTCPPCP
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPCRDELTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

SEQ ID No. 50: subunidade 1 de Het-R2 humana

MCHQQLVISWFSVLFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVV
 LTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG
 EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC
 WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYE
 YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPD
 PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKR
 EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSG
 GGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 51: subunidade 2 de Het-R2 de camundongo

MAQTVRECSL ALLFLFMWLL IKANIDVCKL GTVTVQPAPV
 IPLGSAANIS CSLNPKQGCS
 HYPSSNELIL LKFVNDVLVE NLHGKKVHDH TGHSSTFQVT
 NLSLGMTLFV CKLNCSNSQK
 KPPVPVCGVE ISVGVAPEPP QNISCVQEGE NGTVACSWNS

GKVTYLKTNY TLQLSGPNNL
 TCQKQCFSDN RQNCNRLDLG INLSPDLAES RFIVRVTAI
 DLGNSSSLPH TFTFLDIVIP
 LPPWDIRINF LNASGSRGTL QWEDEGQVVL NQLRYQPLNS
 TSWNMVNATN AKGKYDLRDL
 RPFTEYEFQI SSKLHLSSGS WSNWSESLRT RTPEEEPPGGG
 GSSGRSENIR TAGGGGSRVI
 PVSGPARCLS QSRNLLKTTD DMVKTAREKL KHYSCTAEDI
 DHEDITRDQT STLKTCLPLE
 LHKNESCLAT RETSSTTRGS CLPPQKTSML MTLCLGSIYE
 DLKMYQTEFQ AINAALQNH
 HQQIILDKGM LVAIDELMQS LNHNGETLRQ KPPVGEADPY
 RVKMKLCILL HAFSTRVVTI
 NRVMGYLSSA GGGGSGGGGS GGGGSDKTHT CPPCPAPELL
 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR
 DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKS
 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH
 YTQKSLSLSP GK

SEQ ID No. 52: subunidade 2 de Het-R2 humana

MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNIT
 CSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLSNSQVTGLPLGTTL
 FVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSIQKGEQGTVACTWE
 RGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFFGINLTPESPE
 SNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRC
 TLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTAKGRHDLLDLKPFT
 EYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPPGGGGSSGRSENIR

TAGGGGSRNLPVATPDPMFCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEF
 YPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSC
 LASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQ
 NMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRA
 VTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00293] A descrição do requerente é descrita aqui em modalidades preferidas com referência às Figuras, nas quais números semelhantes representam os mesmos ou elementos semelhantes. A referência ao longo desta especificação a "uma modalidade", "uma modalidade" ou linguagem semelhante significa que um recurso, estrutura ou característica particular descrito em conexão com a modalidade está incluída em pelo menos uma modalidade da presente invenção. Assim, o aparecimento das frases "em uma modalidade", "em uma modalidade" e linguagem semelhante ao longo desta especificação descritivo pode, porém, não necessariamente, se referir à mesma modalidade.

[00294] Os recursos, estruturas ou características descritas da descrição do Requerente podem ser combinados de qualquer maneira adequada em uma ou mais modalidades. Na descrição, aqui, vários detalhes específicos são citados para fornecer uma compreensão completa das modalidades da invenção. Alguém versado na técnica relevante reconhecerá, no entanto, que a composição e/ou método do Requerente pode ser praticado sem um ou mais dos detalhes específicos, ou com outros métodos, componentes, materiais e assim por diante. Em outros casos, estruturas, materiais ou operações bem

conhecidos não são mostrados ou descritos em detalhes para evitar obscurecer aspectos da descrição.

[00295] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui possui o mesmo significado como comumente entendido por alguém versado na técnica. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos aqui também possam ser usados na prática ou no teste da presente descrição, os métodos e materiais preferidos são agora descritos. Os métodos recitados aqui podem ser realizados em qualquer ordem que seja logicamente possível, além de uma ordem particular descrita.

Incorporação por Referência

[00296] Referências e citações a outros documentos, como patentes, pedidos de patentes, publicações de patentes, jornais, livros, artigos, conteúdo da web, foram feitas nesta descrição. Todos esses documentos são aqui incorporados por referência em sua totalidade para todos os fins. Qualquer material, ou parte dele, que é dito ser incorporado por referência aqui, porém, que entra em conflito com as definições existentes, declarações ou outro material de descrição explicitamente estabelecido aqui, só é incorporado na medida em que nenhum conflito surja entre esse material incorporado e o presente material de descrição. No caso de um conflito, o conflito deve ser resolvido em favor da presente descrição como a descrição preferida.

Equivalentes

[00297] Os exemplos representativos destinam-se a ajudar a ilustrar a invenção e não pretendem, nem devem ser interpretados como limitando o escopo da invenção. Na verdade, várias modificações da invenção e muitas outras modalidades das mesmas, além daquelas mostradas e descritas aqui, tornar-se-ão evidentes para aqueles versados na técnica a partir do conteúdo completo deste documento,

incluindo os exemplos e as referências à literatura científica e de patente incluída aqui. Os exemplos contêm informações adicionais importantes, exemplificação e orientação que podem ser adaptadas à prática desta invenção em suas várias modalidades e seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

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

uma primeira unidade estrutural: uma ou duas subunidades de interleucina 12 (IL12) selecionada a partir das subunidades P35 e P40, em que a primeira unidade estrutural está localizada no N-terminal da proteína de fusão;

uma segunda unidade estrutural: um fragmento Fc de anticorpo, em que a segunda unidade estrutural está localizada no C-terminal da proteína de fusão; e

um primeiro segmento de ligante que liga covalentemente a primeira unidade estrutural e a segunda unidade estrutural ou liga covalentemente as duas subunidades da primeira unidade estrutural.

2. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que as subunidades P35 e P40 são derivadas de um mamífero selecionado a partir do grupo que consiste em humano, macaco, camundongo, cachorro, rato, vaca, porco e ovelha.

3. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o mamífero é um camundongo.

4. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o mamífero é humano.

5. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o fragmento Fc de anticorpo compreende um fragmento Fc humano.

6. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o fragmento Fc de anticorpo compreende uma IgG1 humana.

7. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a IgG1 humana é

Fc-knob humano ou *Fc-hole* humano.

8. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 5 a 7, caracterizada pelo fato de que a subunidade P35 possui a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 3.

9. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 e 4 a 7, caracterizada pelo fato de que a subunidade P35 possui a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 4.

10. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1a 3 e 5 a 8, caracterizada pelo fato de que a subunidade P40 possui a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 1.

11. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 e 4 a 9, caracterizada pelo fato de que a subunidade P40 possui a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 2.

12. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que o primeiro segmento de ligante (L1) possui a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 12.

13. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um peptídeo de sinal modificado no N-terminal da primeira unidade estrutural.

14. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o peptídeo de sinal modificado no N-terminal da subunidade P35, é um primeiro peptídeo de sinal (SP1) compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 27.

15. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o peptídeo de sinal modificado no N-terminal da subunidade P35, é um primeiro peptídeo de sinal (SP1) que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 28.

16. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o peptídeo de sinal modificado no N-terminal da subunidade P40, é um segundo peptídeo de sinal (SP2) que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 29.

17. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o peptídeo de sinal modificado no N-terminal da subunidade P40, é um segundo peptídeo de sinal (SP2) compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 30.

18. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato de que compreende ainda:

uma subsequência de receptor de interleucina 12 (IL12R), ligada ao N-terminal da primeira unidade estrutural; e

um segundo segmento de ligante (L2) que liga covalentemente IL12R à primeira unidade estrutural.

19. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que IL12R é selecionado de IL12R β 1 (R β 1) e IL12RJ2 (R β 2).

20. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizada pelo fato de que o segundo segmento de ligante L2 é capaz de ser reconhecido e hidrolisado por uma enzima proteolítica expressa especificamente em um microambiente tumoral.

21. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 19 ou

20, caracterizada pelo fato de que R β 1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 8 e R β 2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No.10.

22. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizada pelo fato de que R β 1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 9 e R β 2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No.11.

23. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, caracterizada pelo fato de que a enzima proteolítica expressa especificamente no microambiente tumoral é uma metaloproteinase matriz.

24. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que a metaloproteinase matriz é a metaloproteinase matriz 14 (MMP14).

25. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 24, caracterizada pelo fato de que o segmento de ligante L2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 13-26.

26. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 25, caracterizada pelo fato de que

o C-terminal de IL12R está ligado ao N-terminal da primeira unidade estrutural por meio do segmento de ligante L2; e

o C-terminal da primeira unidade estrutural e o N-terminal da segunda unidade estrutural estão ligados pelo segmento de ligante L1;

quando a primeira unidade estrutural compreende duas subunidades, o C-terminal da primeira subunidade e o N-terminal da segunda subunidade são ligados pelo segmento de ligante L1.

27. Proteína homodimérica ou heterodimérica, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína de fusão

como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 26.

28. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um homodímero do monômero compreendendo uma subunidade P40, um segmento de ligante L1, uma subunidade P35, um segmento de ligante L1, uma proteína de fusão de IgG1 humana, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 31.

29. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um homodímero do monômero compreendendo uma subunidade P40, um segmento de ligante L1, uma subunidade P35, um segmento de ligante L1, uma proteína de fusão de IgG1 humana, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 32.

30. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um heterodímero de

um primeiro monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P40, um segmento de ligante L1 e um *Fc-knob* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 18; e

um segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P35 compreendendo o segmento de ligante L1 e um *Fc-hole* humano, e possuindo a estrutura da sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 35.

31. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um heterodímero de

um primeiro monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P40, um segmento de ligante L1 e um *Fc-knob* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos

apresentada em SEQ ID No. 18; e

um segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P35 compreendendo o segmento de ligante L1 e um *Fc-hole* humano, e possuindo a estrutura da sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 36.

32. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um homodímero do monômero: IL12RQ1, um segmento de ligante L2, uma subunidade P40, um segmento de ligante L1, uma subunidade P35, um segmento de ligante L1 e IgG1 humana, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 37.

33. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um homodímero do monômero: IL12RQ1, um segmento de ligante L2, uma subunidade P40, um segmento de ligante L1, uma subunidade P35, um segmento de ligante L1 e IgG1 humana, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 38.

34. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um homodímero do monômero: IL12R β 2, um segmento de ligante L2, uma subunidade P40, um segmento de ligante L1, uma subunidade P35, um segmento de ligante L1 e IgG1 humana, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 39.

35. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um homodímero do monômero: IL12R β 2, um segmento de ligante L2, uma subunidade P40, um segmento de ligante L1, uma subunidade P35, um segmento de ligante L1 e IgG1 humana, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 40.

36. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo

com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um heterodímero de

um primeiro monômero: R β 1, um segmento de ligante L2, uma subunidade P40, um segmento de ligante L1, uma proteína de fusão de *Fc-knob* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 41; e

um segundo monômero: uma proteína de fusão de R β 2, um segmento de ligante L2, uma subunidade P35, um segmento de ligante L1 e *Fc-hole* humano de IL12, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 43.

37. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um heterodímero de

um primeiro monômero: R β 1, um segmento de ligante L2, uma subunidade P40, um segmento de ligante L1, uma proteína de fusão de *Fc-knob* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 42; e

um segundo monômero: uma proteína de fusão de R β 2, um segmento de ligante L2, uma subunidade P35, um segmento de ligante L1 e um *Fc-hole* humano de IL12, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 44.

38. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um heterodímero de

um primeiro monômero: R β 1, um segmento de ligante L2, uma subunidade P40, um segmento de ligante L1, uma proteína de fusão de um *Fc-knob* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 45; e

um segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P35 compreendendo o peptídeo de

sinal SP1, um segmento de ligante L1, um *Fc-hole* humano e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 47.

39. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um heterodímero de

um primeiro monômero: R β 1, um segmento de ligante L2, uma subunidade P40, um segmento de ligante L1, uma proteína de fusão de um *Fc-knob* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 46; e

um segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P35 compreendendo o peptídeo de sinal SP1, um segmento de ligante L1, um *Fc-hole* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 48.

40. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um heterodímero de

um primeiro monômero: uma proteína de fusão compreendendo uma subunidade P40, um segmento de ligante L1 e um *Fc-knob* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No.49; e

um segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo R β 2, um segmento de ligante L2, uma subunidade P35, um segmento de ligante L1 e um *Fc-hole* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 51.

41. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é um heterodímero de

um primeiro monômero: uma proteína de fusão

compreendendo uma subunidade P40, um segmento de ligante L1 e um *Fc-knob* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No.50; e

um segundo monômero: uma proteína de fusão compreendendo R β 2, um segmento de ligante L2, uma subunidade P35, um segmento de ligante L1 e um *Fc-hole* humano, e possuindo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID No. 52.

42. Proteína homodimérica ou heterodimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 41, caracterizada pelo fato de que é hidrolisada por uma enzima proteolítica expressa especificamente em um microambiente tumoral.

43. Proteína, caracterizada pelo fato de que é substancialmente purificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42.

44. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica uma proteína como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 43.

45. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo, como definido na reivindicação 44.

46. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 43 e um excipiente, veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

47. Método para tratar uma doença ou condição, caracterizado pelo fato de que compreende:

administrar a um paciente em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 43 ou uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 46,

em que a doença ou condição é selecionada dentre

hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a administração de um ou mais dentre quimioterapia, radioterapia, terapia direcionada ou imunoterapia no indivíduo.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de um agente de quimioterapia.

50. Método, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma radioterapia.

51. Uso de uma proteína, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 43, caracterizado pelo fato de que é para o tratamento ou redução de uma doença ou distúrbio.

52. Uso de uma proteína, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 43, e um excipiente, veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para tratar ou reduzir uma doença ou distúrbio.

53. Uso, de acordo com a reivindicação 51 ou 52, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é selecionado dentre câncer de cabeça e pescoço, câncer de endométrio, câncer colorretal, câncer de ovário, câncer de mama, melanoma, câncer de pulmão, câncer renal, câncer de fígado, câncer anal, sarcoma, linfoma, leucemia, tumores cerebrais, câncer gástrico, câncer testicular, câncer pancreático, câncer de tireoide.

54. Uso de uma proteína, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 43, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento.

55. Uso, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado

pelo fato de que o medicamento é um fármaco antitumoral.

56. Uso, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que o fármaco antitumoral é eficaz para o tratamento de linfoma de células B ou câncer anticolorretal.

57. Linhagem celular, caracterizada pelo fato de que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 43.

58. Método para preparar uma proteína, caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo da linhagem celular, como definida na reivindicação 57.

59. Método, de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que compreende ainda purificar ou isolar uma proteína produzida.

60. Método para preparar uma proteína, caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer um vetor de expressão que codifica uma proteína como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 43;

introduzir em uma célula hospedeira o vetor de expressão;

cultivar a célula hospedeira em meio sob condições suficientes para expressar a proteína; e

purificar a proteína da célula ou meio hospedeiro.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é 293F.

62. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é CHO.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 60 a 62, caracterizado pelo fato de que a introdução do vetor de expressão é por transfecção transitória ou uma linhagem celular estável.

64. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 60 a 63, caracterizado pelo fato de que a purificação da proteína é por cromatografia de afinidade da Proteína A/G ou métodos de exclusão por tamanho.

65. Proteína isolada, caracterizada pelo fato de que é produzida por um método, como definido em qualquer uma das reivindicações 60 a 64.

66. Proteína isolada, de acordo com a reivindicação 65, caracterizada pelo fato de que é substancialmente pura.

FIG. 1

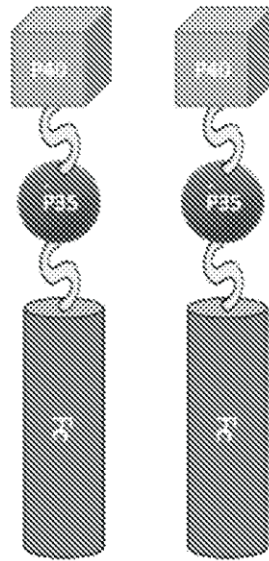


FIG. 2

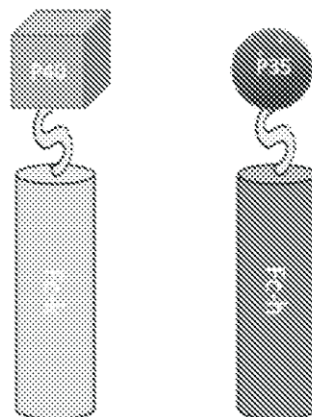


FIG. 3

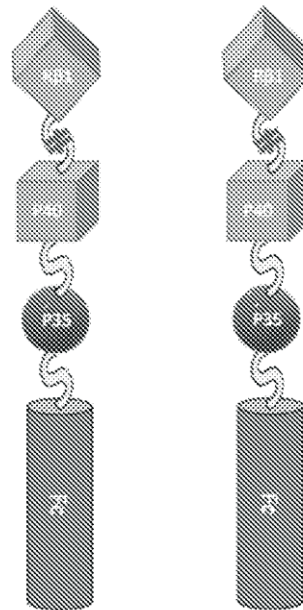


FIG. 4

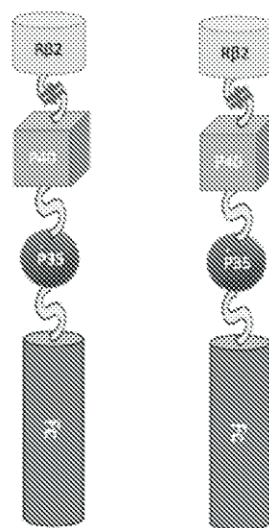
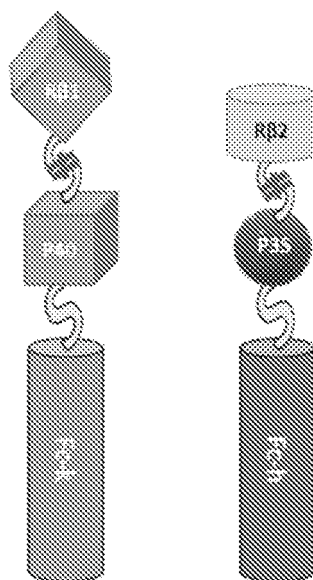


FIG. 5



FUG. 6

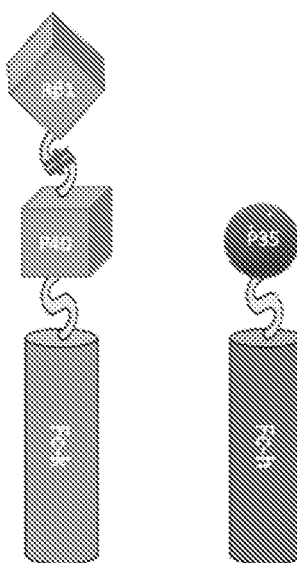


FIG. 7

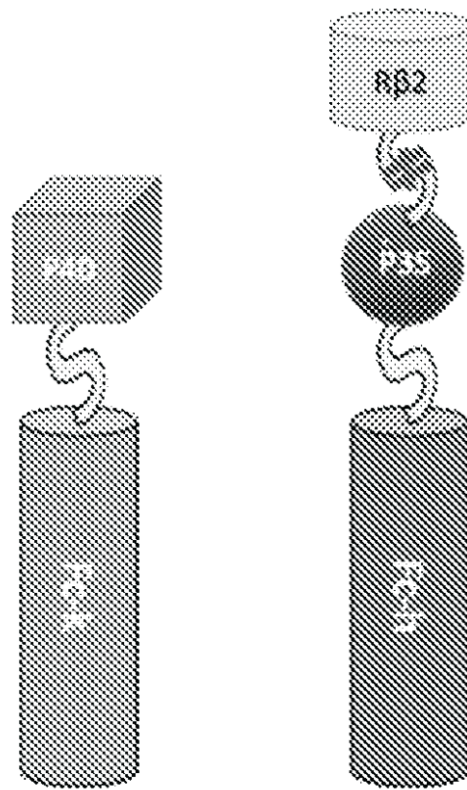


FIG. 8

Il12 de camundongo

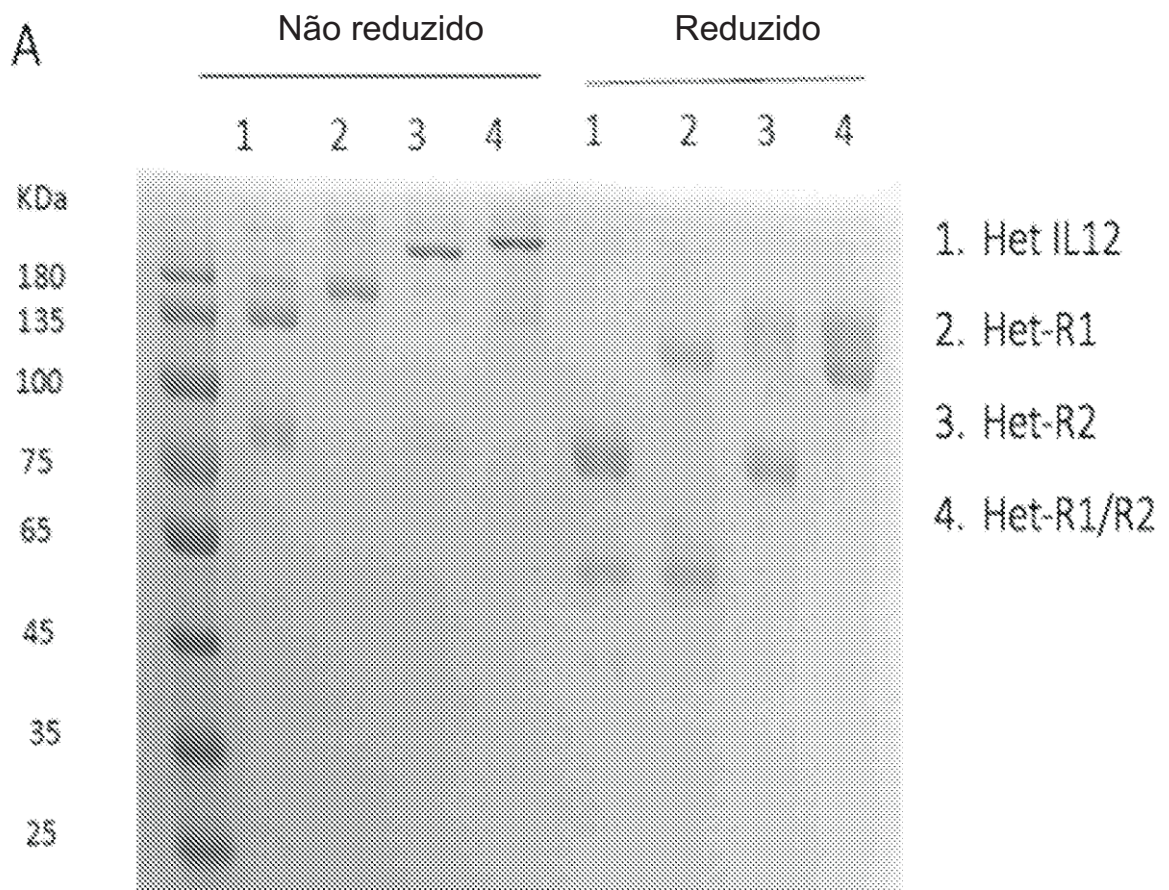


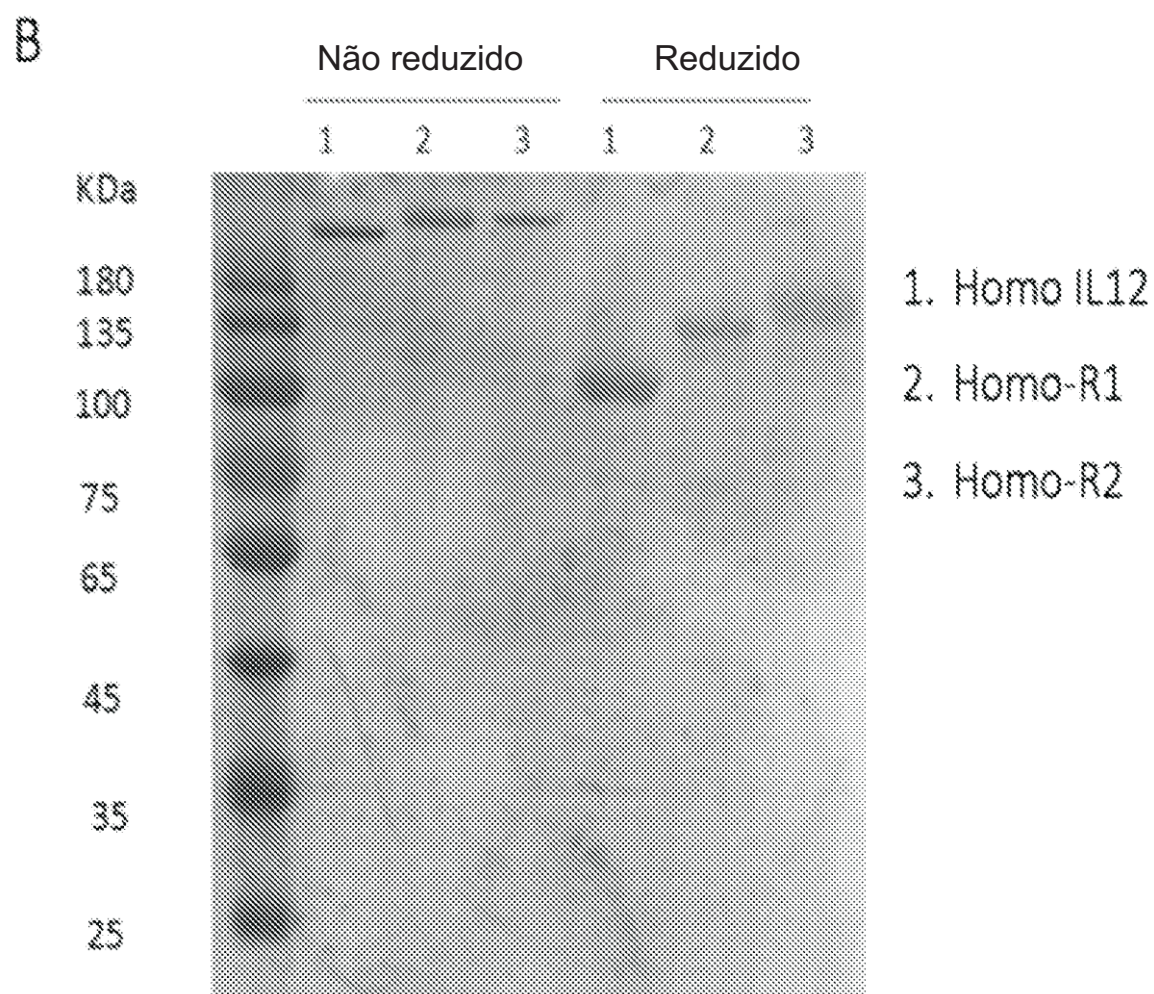
FIG. 8 (Cont)

FIG. 9

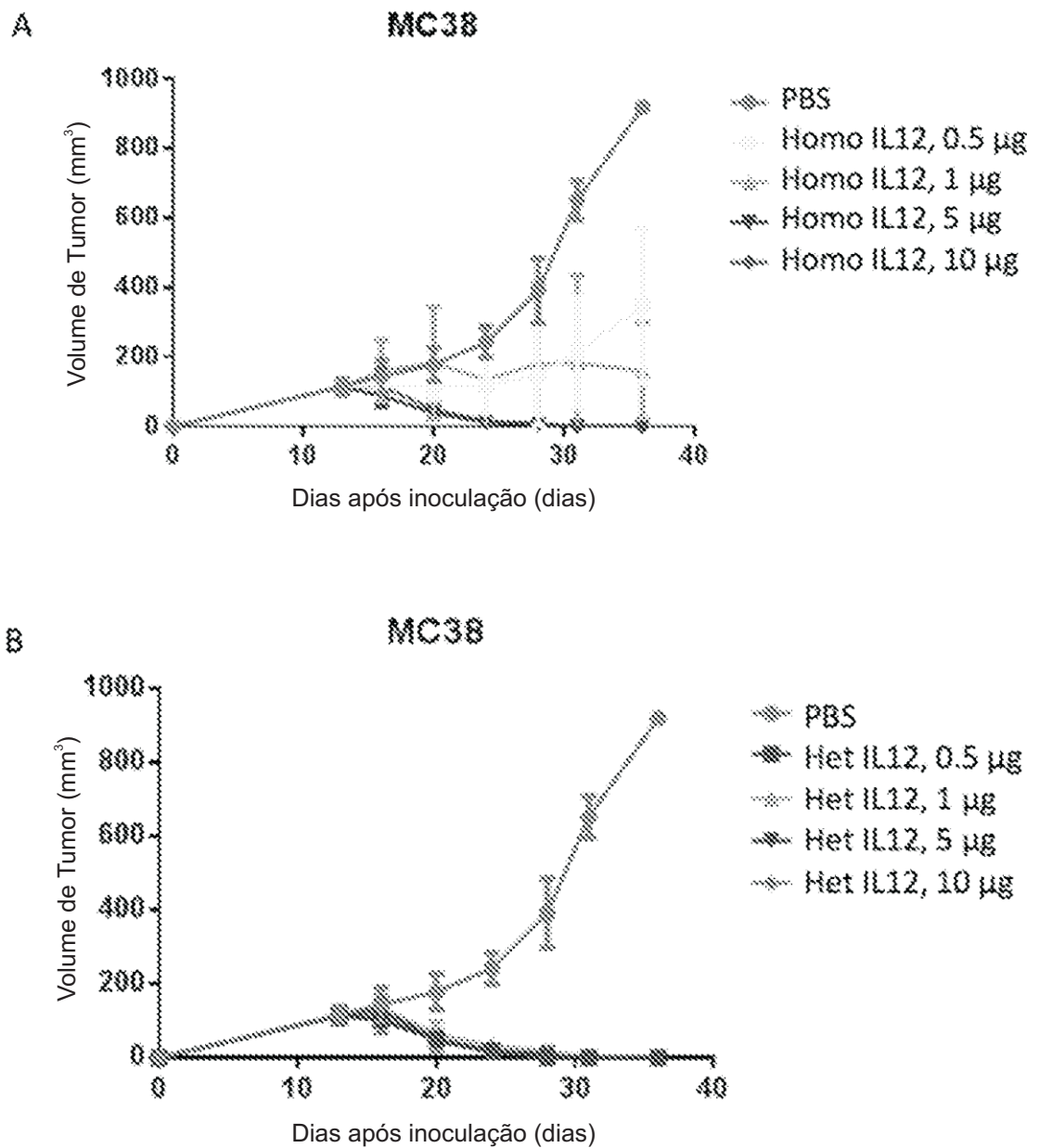


FIG. 10

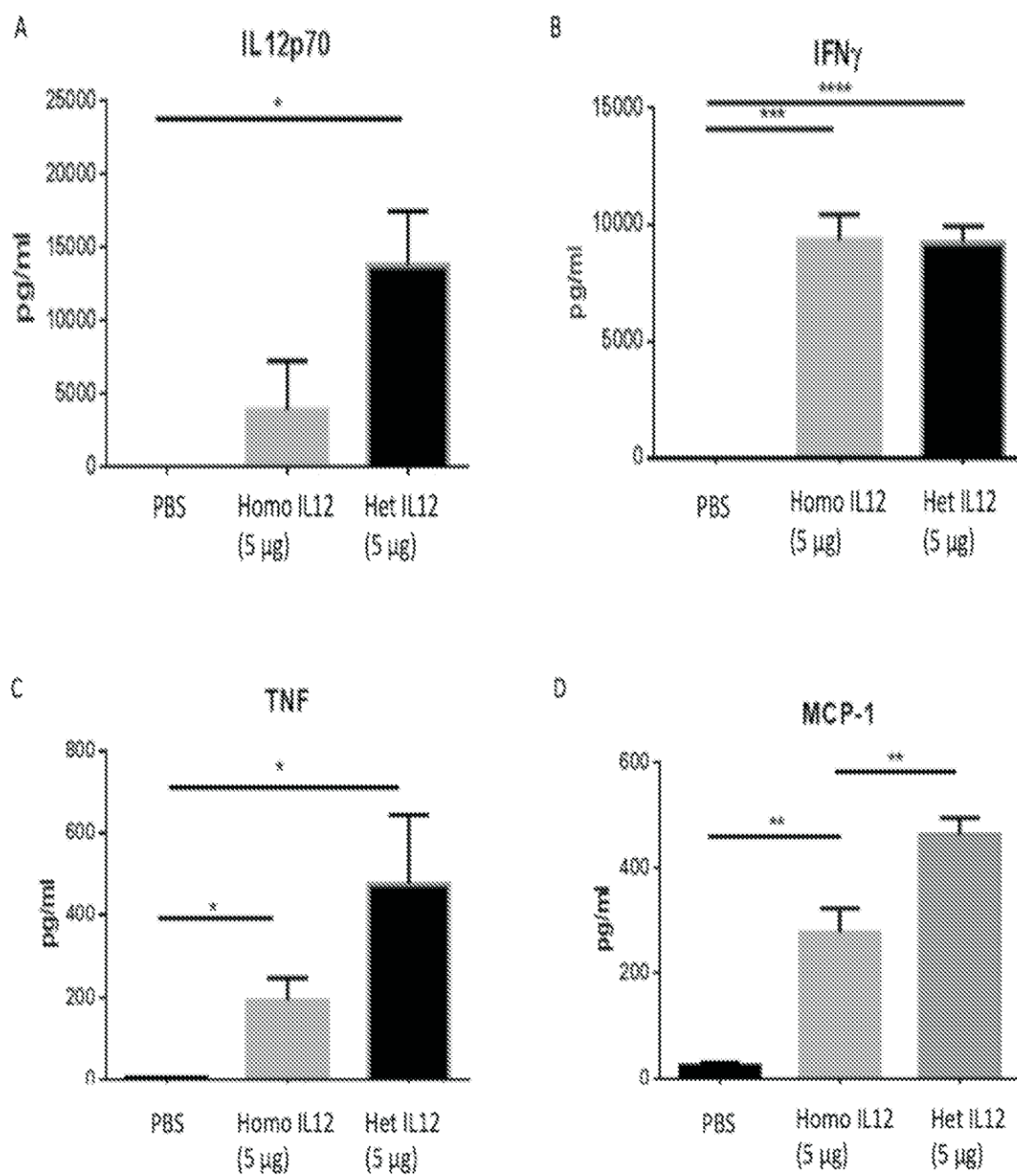


FIG. 10 (Cont)

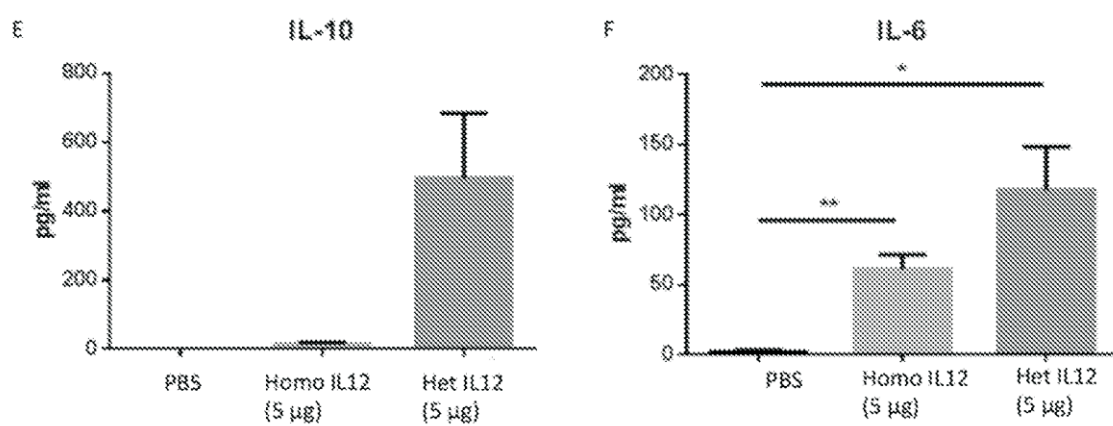


FIG. 11

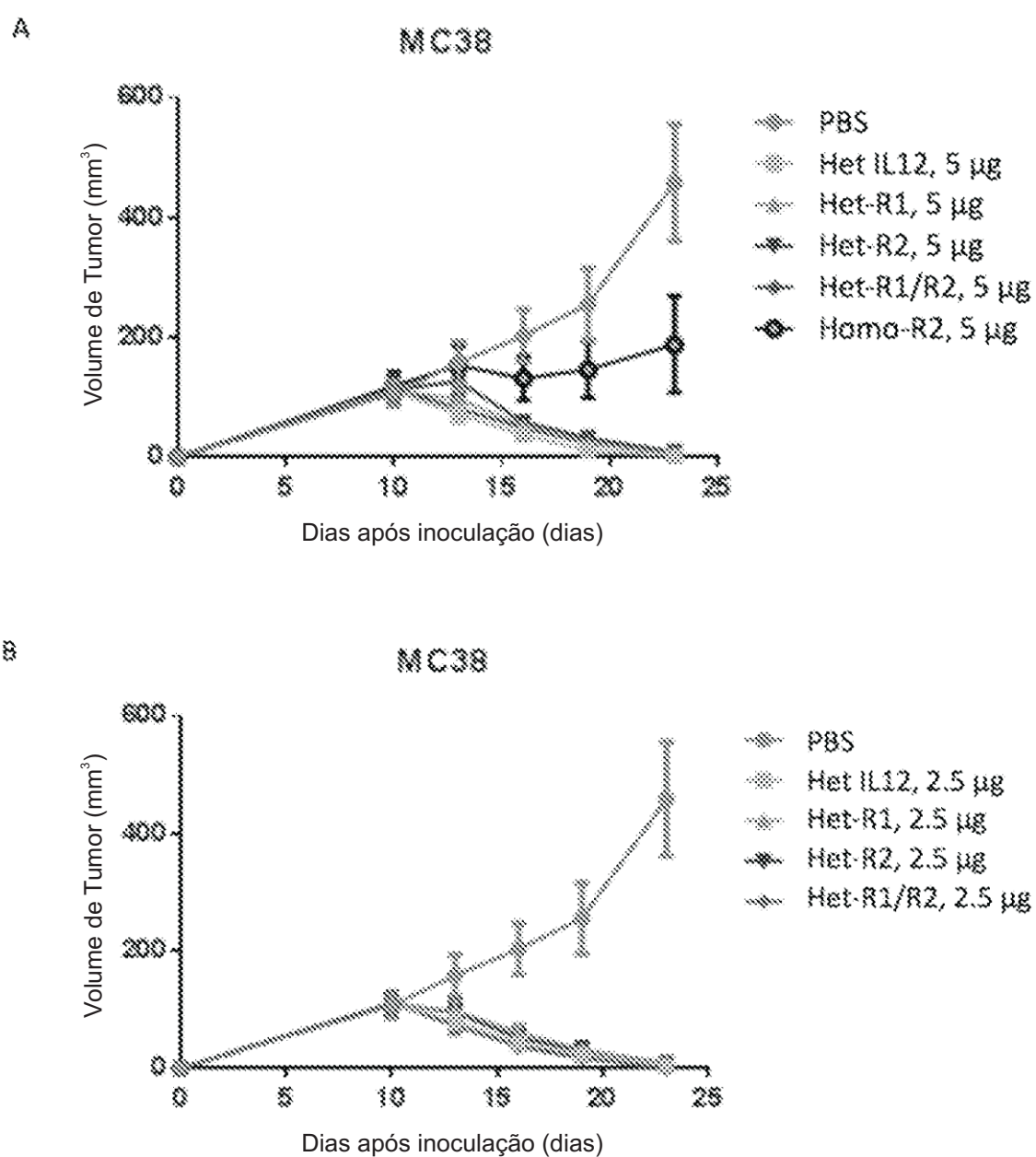


FIG. 12

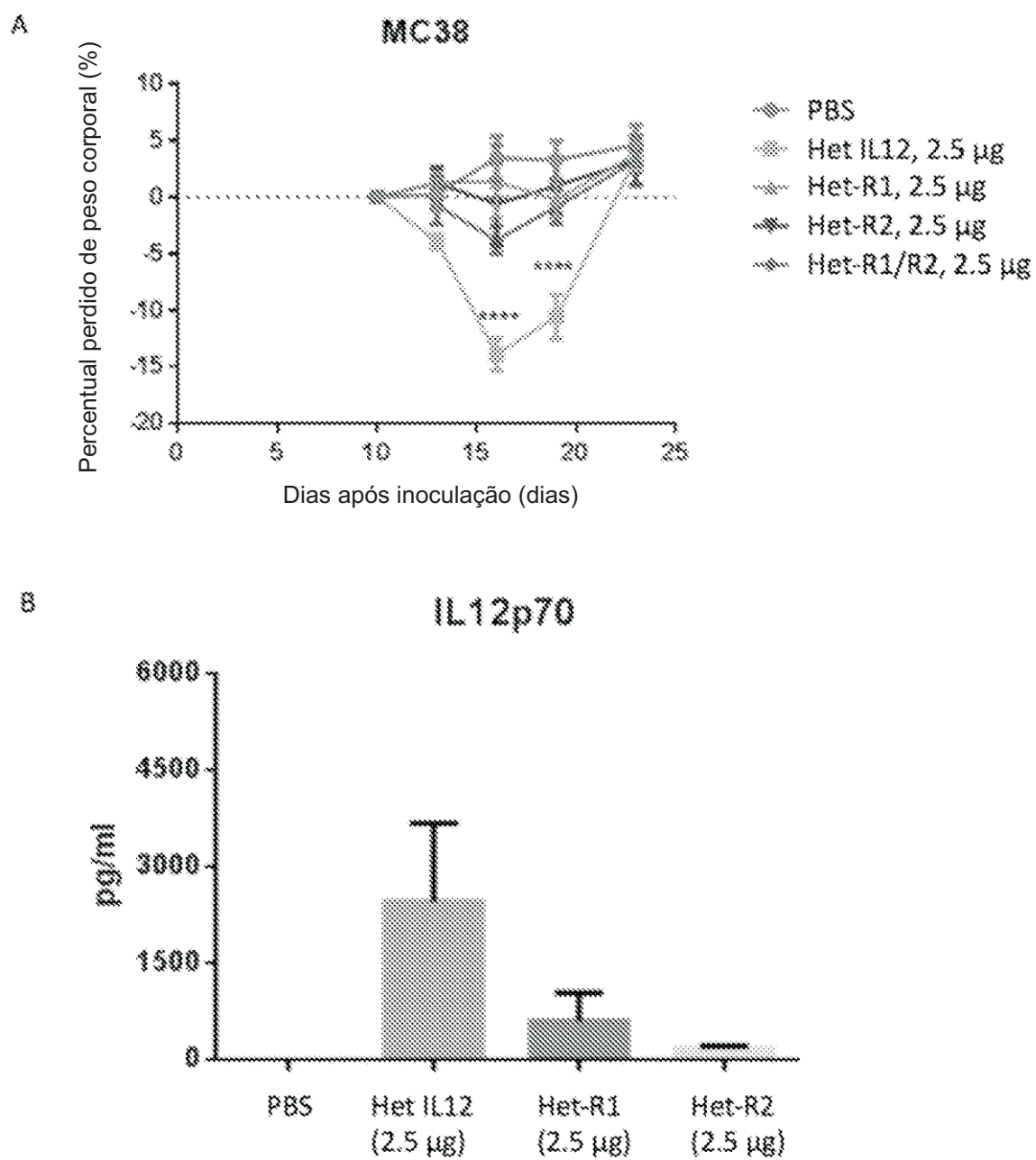


FIG. 12 (cont)

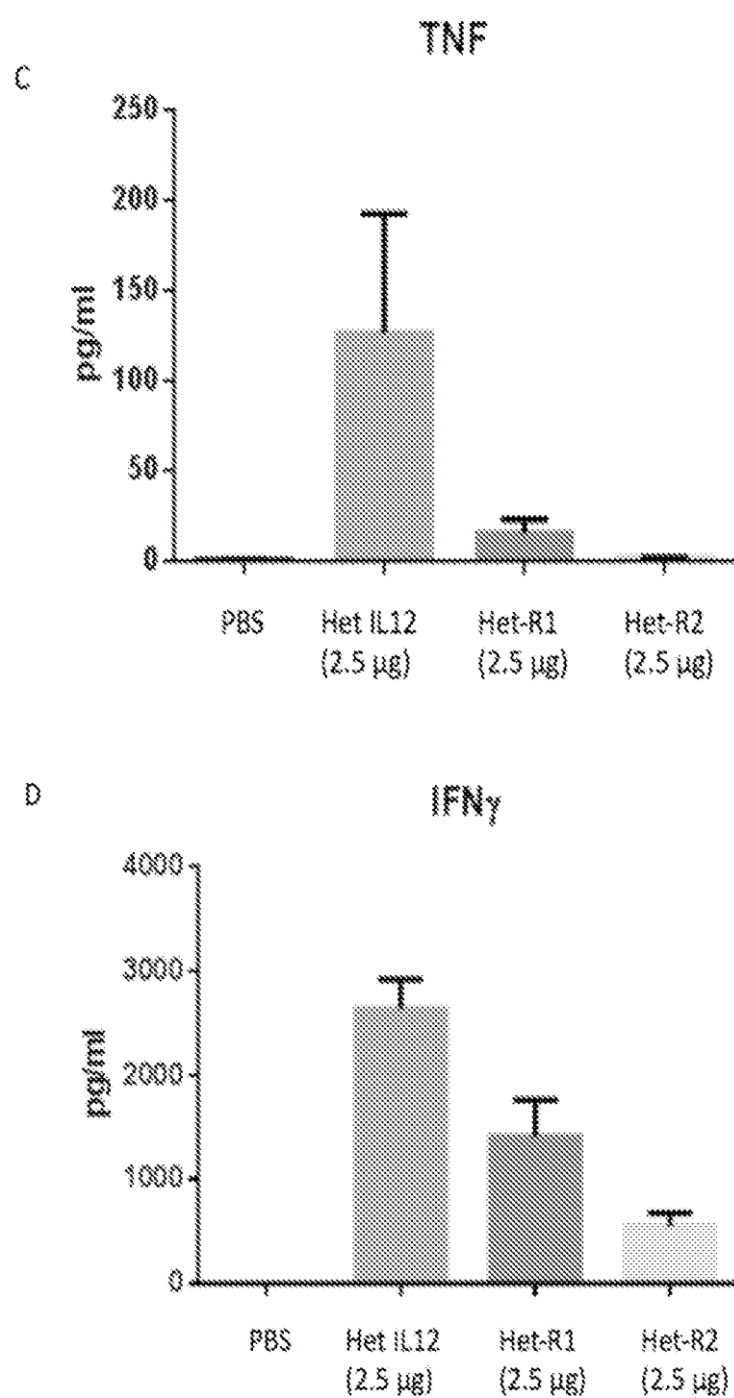


FIG. 12 (cont)

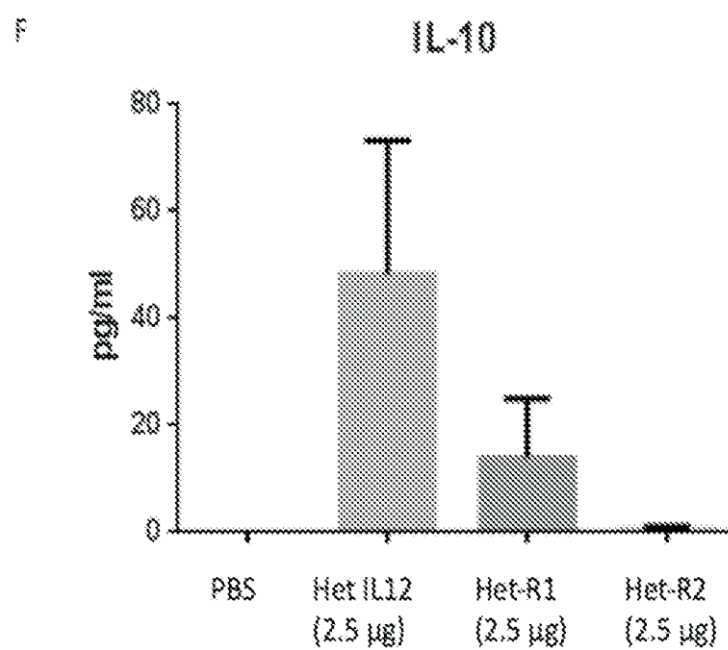
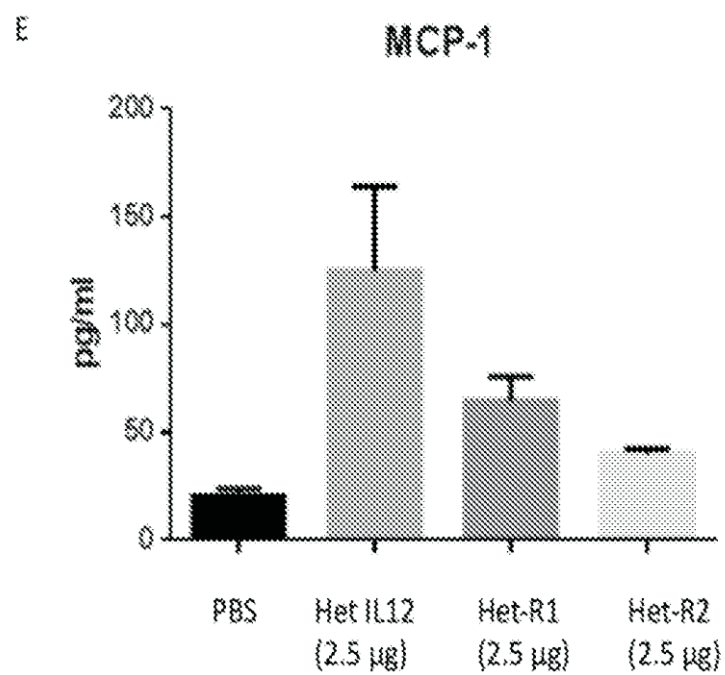


FIG. 12 (cont)

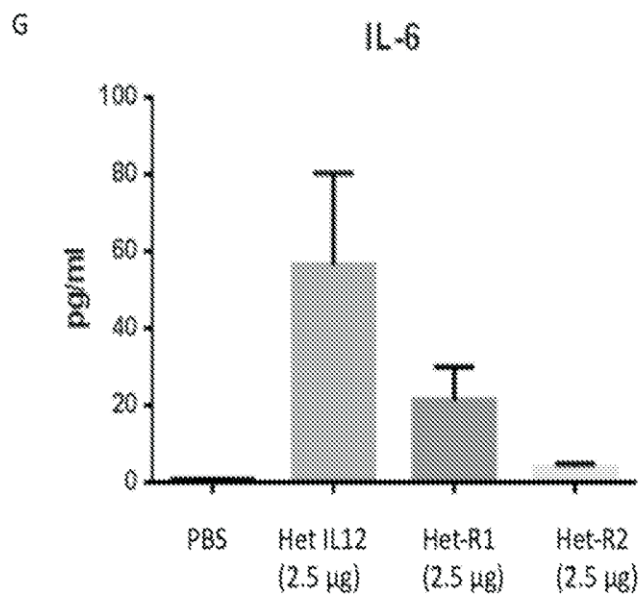


FIG. 13

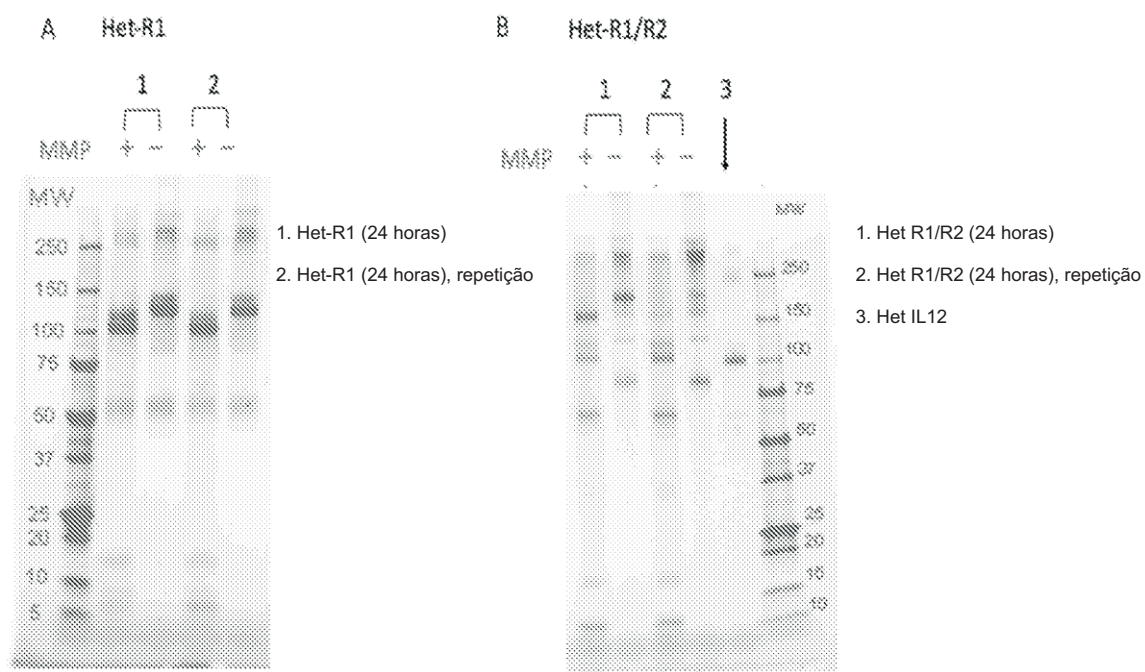
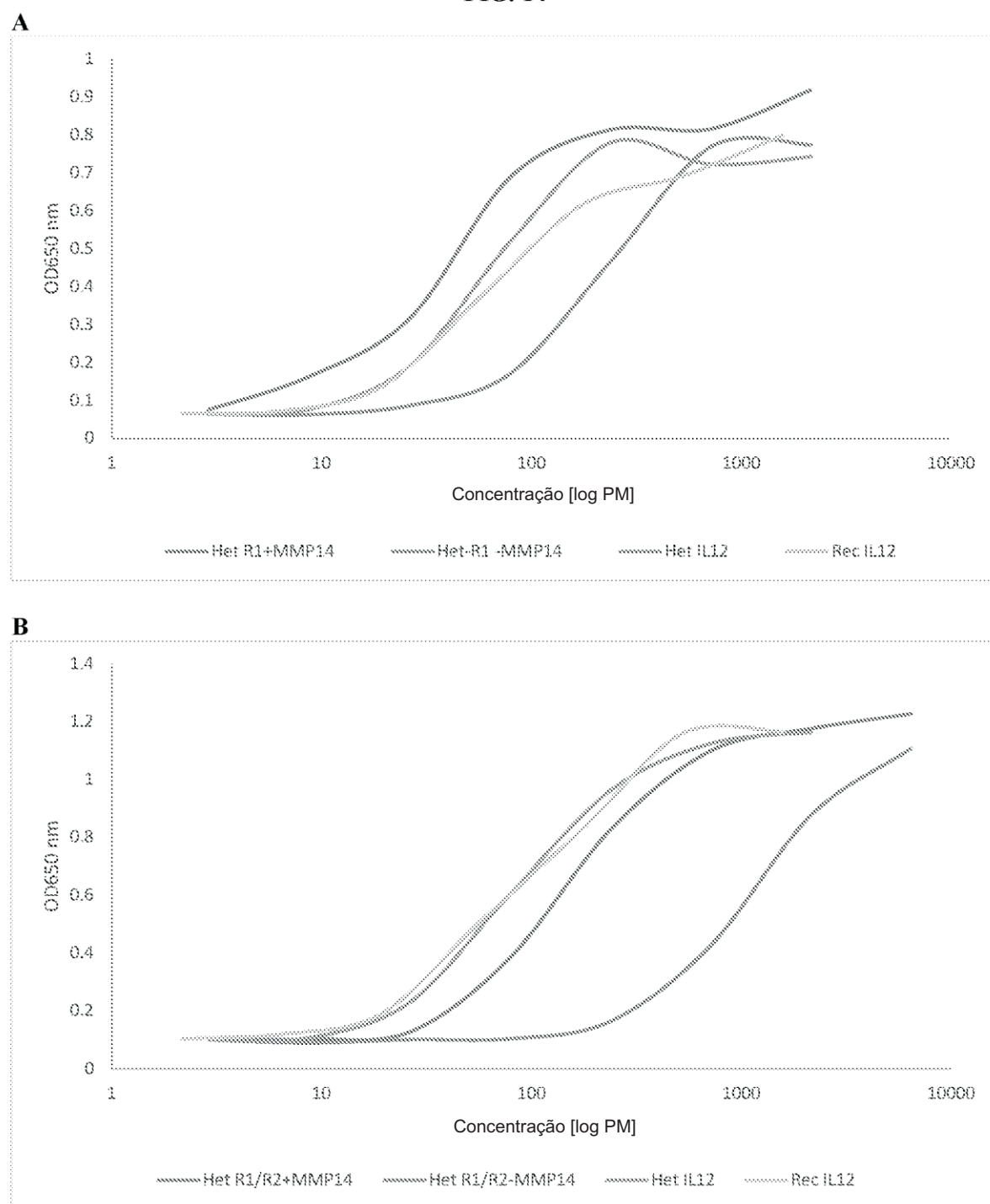


FIG. 14



RESUMO

Patente de Invenção: **“PROTEÍNAS DE FUSÃO DE INTERLEUCINA 12 E COMPOSIÇÕES E MÉTODOS TERAPÊUTICOS DAS MESMAS”**.

A presente invenção refere-se a proteínas de fusão de Interleucina 12 e profármacos, e composições e métodos de preparação das mesmas, úteis no tratamento de várias doenças e distúrbios (por exemplo, hiperplasia, tumor sólido ou malignidade hematopoética).