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

(21) BR 112020013244-6 A2

(22) Data do Depósito: 04/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 01/12/2020

(54) Título: PROTEÍNAS DE FUSÃO DE ANTICORPO CITOSINA-DESAMINASE DE DOMÍNIO ÚNICO

(51) Int. Cl.: C07K 14/725; C07K 16/28; C07K 16/32; C12N 9/78; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 04/01/2018 US 62/613,653.

(71) Depositante(es): SHANGHAI LUMOSA THERAPEUTICS CO., LTD.; LUMOSA THERAPEUTICS CO., LTD..

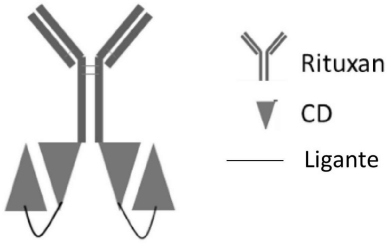
(72) Inventor(es): PEI-JIUN CHEN; SHU-HUA LEE.

(86) Pedido PCT: PCT IB2019000013 de 04/01/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/135159 de 11/07/2019

(85) Data da Fase Nacional: 26/06/2020

(57) Resumo: A revelação se refere às proteínas de fusão, métodos para produzir proteínas de fusão e métodos de uso de proteínas de fusão, em que as proteínas de fusão compreendem um anticorpo funcional de domínio único (sdAb) ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína citosina desaminase (CD) ou uma proteína funcional variante do mesmo, opcionalmente conectado via um ligante peptídico. As proteínas de fusão da revelação também têm atividade de CD. A revelação também se refere a composições ou formulações farmacêuticas compreendendo essas proteínas de fusão e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, bem como usos médicos dessas proteínas de fusão.



"PROTEÍNAS DE FUSÃO DE ANTICORPO CITOSINA-DESAMINASE DE DOMÍNIO ÚNICO"

PEDIDOS CORRELATOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório número 62/613.653, depositado em 4 de janeiro de 2018, incorporado como referência em sua totalidade.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS APRESENTADA ELETRONICAMENTE

[0002] Uma cópia oficial da listagem de sequências foi enviada eletronicamente via EFS-Web como uma listagem de sequência formatada em ASCII com um arquivo denominado 13075_0003_SL.txt, criado em 3 de janeiro de 2019 e com um tamanho de 385.734 bytes. A listagem de sequências contida neste documento formatado em ASCII faz parte do relatório descritivo e é incorporada ao presente documento como referência na sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] A revelação se refere às proteínas de fusão, métodos de produção de proteínas de fusão e métodos de uso de proteínas de fusão. Mais especificamente, a revelação se refere às proteínas de fusão que compreendem um anticorpo de domínio único funcional (sdAb) (por exemplo, um VHH ou um nanocorpo), ou uma variante funcional do mesmo, contra uma proteína celular e uma proteína citosina desaminase (CD), ou uma variante funcional da mesma, opcionalmente conectada via um ligante peptídico. O sdAb ou sua variante funcional pode ser conectada ao terminal N ou ao terminal C da proteína CD ou à sua variante funcional, opcionalmente através de um ligante

peptídico. As proteínas de fusão da revelação também têm atividade de CD. A revelação também se refere às composições ou formulações farmacêuticas compreendendo essas proteínas de fusão e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, bem como usos médicos dessas proteínas de fusão.

ANTECEDENTES

[0004] O quimioterápico 5-fluoruracila (5-FU) tem sido amplamente utilizado no tratamento do câncer, mas a terapia sistêmica com 5-FU está associada a efeitos colaterais tóxicos graves. Este agente inibe o crescimento celular interferindo na transcrição e pode ser útil no tratamento de câncer e outras doenças proliferativas. A citosina-desaminase (CD) converte o pró-fármaco não tóxico 5-fluorcitosina (5-FC) no agente citotóxico 5-fluoruracila. 5-FC não é tóxico para as células humanas devido à falta de CD nas células humanas. O gene da citosina-desaminase, coadministrado com o pró-fármaco 5-fluorcitosina, é um dos sistemas de suicídio mais amplamente testados na terapia gênica do câncer. A expressão de um gene CD dentro de um tumor pode induzir, após tratamento com 5-FC do indivíduo, a produção local de 5-fluoruracila, resultando em quimioterapia intratumoral. A combinação da administração de 5-FC e CD é frequentemente associada à toxicidade sistêmica. Existe, portanto, a necessidade de meios alternativos para utilizar a estratégia de combinação CD/5-FC no tratamento de doenças proliferativas.

[0005] A terapia enzimática pró-fármaco dirigida a anticorpos (ADEPT) foi desenvolvida para superar essa limitação. A enzima ativadora, conjugada com um anticorpo

específico para o tumor, é administrada nas células tumorais, seguida pela administração do pró-fármaco que é inerte até ser ativado pela enzima. Assim, a toxicidade sistêmica pode ser evitada.

[0006] Park e outros divulgaram uma proteína de fusão recombinante contendo o domínio de ligação ao hialuronano de TSG-6 (Link) e citosina desaminase de levedura (CD). Nos seus estudos, várias construções de Link-CD foram expressas em células RIPL *E. coli* BL21-Codon Plus® (DE3), tais como GST-tag, (Gly4Ser) 3 (SEQ ID NO: 188). A maioria das proteínas expressas agregou-se nos corpos de inclusão, apesar dos esforços para aumentar o acúmulo de proteína solúvel. Em média, cerca de 500 pg/L da proteína purificada foram recuperados da fração solúvel por litro de meio de cultura (Mol Pharm. 2009; 6(3): 801-812).

[0007] Deckert e outros divulgaram uma proteína recombinante A33scFv-citosina-desaminase e demonstraram ligação específica ao antígeno e atividade enzimática da mesma. A A33scFv-CD foi expressa por um sistema bacteriano controlado por polimerase de T7-RNA usando BL21 *Escherichia coli* λDE3 lisógenos. As proteínas de fusão foram expressas como corpos de inclusão com um rendimento final de cultura de cerca de 100 pg/L (British Journal of Cancer (2003) 88, 937-939).

[0008] É difícil expressar uma proteína heterogênea que consiste em sequências de anticorpos humanos e enzimas bacterianas em um único sistema de expressão. Coelho e outros tentaram produzir a proteína recombinante A33scFv-citosina desaminase em *Pichia pastoris* para selecionar um clone de alto rendimento para produção.

Nos seus estudos, um clone *Pichia* transformante de pPICZaA de alta produção foi selecionado e a proteína alvo pode ser secretada no sobrenadante da cultura. O rendimento total após a purificação foi de cerca de 1,0 micrograma/L (International Journal of Oncology 31: 951-957, 2007).

[0009] Todos estes resultados indicaram que fusões de um anticorpo específico de um tumor ou fragmento de ligação ao antígeno com CD não são adequadas para produção industrial. Portanto, há uma necessidade de proteínas de fusão CD que tenham um rendimento promissor de produção para uso industrial e que demonstrem ligação específica ao antígeno e atividade enzimática.

SUMÁRIO

[0010] Esta revelação fornece proteínas de fusão, métodos para produzir proteínas de fusão e métodos para usar proteínas de fusão. A seguir, são exemplos de formas de realização não limitativas da revelação

[0011] Em algumas formas de realização da revelação, a proteína de fusão compreende a fórmula I ou a fórmula II:

N-(L) n-C (fórmula I);

C-(L) n-N (fórmula II);

em que N é um anticorpo de domínio único (sdAb) ou uma variante funcional do mesmo, L é um ligante peptídico e n = 0-50 e C é uma proteína da citosina desaminase (CD) ou uma variante funcional da mesma.

[0012] Em alguns aspectos dessas formas de realização, a proteína de fusão compreende a fórmula I e o terminal C de um ligante peptídico ou o terminal C de uma sdAb ou uma variante funcional do mesmo é fundido ao

terminal N de uma proteína CD ou sua variante funcional. Por exemplo, em alguns aspectos, um ligante peptídico não está presente e o terminal C de um sdAb ou sua variante funcional é fundido ao terminal N de uma proteína CD ou sua variante funcional. Em alguns aspectos, pelo menos um ligante peptídico está presente e o terminal C de um sdAb ou sua variante funcional é fundido ao terminal N de um ligante peptídico, e o terminal C de um ligante peptídico é fundido ao terminal N de outro ligante peptídico ou ao terminal N de uma proteína CD ou sua variante funcional.

[0013] Em outros aspectos dessas formas de realização, a proteína de fusão compreende a fórmula II e o terminal C de um ligante peptídico ou o terminal C de uma proteína CD ou sua variante funcional é fundido ao terminal N de um sdAb ou uma variante funcional do mesmo. Por exemplo, em alguns aspectos, um ligante peptídico não está presente e o terminal C de uma proteína CD ou sua variante funcional é fundido ao terminal N de um sdAb ou uma variante funcional do mesmo. Em alguns aspectos, pelo menos um ligante peptídico está presente e o terminal C de uma proteína CD ou sua variante funcional é fundido ao terminal N de um ligante peptídico, e o terminal C de um ligante peptídico é fundido ao terminal N de outro ligante peptídico ou ao terminal N de um sdAb ou uma sua variante funcional.

[0014] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente na fórmula I. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão é a fórmula I.

[0015] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente na fórmula II. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão é a fórmula II.

[0016] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional se liga a um alvo, em que o alvo é selecionado do grupo que consiste em uma molécula de membrana celular, uma molécula segregada e uma molécula intracelular. Em algumas formas de realização, o alvo é um antígeno associado ao tumor ou um antígeno específico do tumor.

[0017] Em algumas formas de realização, o alvo é selecionado do grupo que consiste em EGFR, 5T4, A33, AFP, Beta-catenina, BRCA1, BRCA2, C242, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23, CD30, CD3, CD37, CD40, CD44, CD5, CD51, CD52, CD56, CD64, CD74, CD80, CDCP1, c-KIT, COX-2, cMET, CSF1R, CTEA-4, EGF2, ErbB2, ErbB3, FGFR1, FGFR2, FGFR3 , FET3, HER2, HER3, HIF-Ia, HEA-DR, IGF-IR, mTOR, NPC-1C, P53, PDGFRα, PDGFRβ, PLGF, PSA, RGMa, RoN, TNF, TP53, TPD52, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, CA-IX, avβ3, α5β1, FAP, glicoproteína 75, TAG-72, MUC16, NR-LU-13, SLAMF7, EGP40, BAFF, PRF-3, antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno de membrana específico da próstata, MART-l, gp100, antígenos de câncer de testículo (CT) (por exemplo,NY-ESO-l, MAGE-A3, MAGE-A1), hTERT, Mesotelina, MCC, Mum-l, ERBB2IP, EpCAM, TfR, integrina aa6bb4, HGFR, PTP-LAR, CD147, CDCP1, CEACAM6, JAM1, integrina α3β1, integrina αvβ3, PD-L1, AXL, CDH6, DLL3, EDNRB, EFNA4, NEPP3, EPHA2, FOLR1, LewisY, GPNMB, GUCY2C, HAVCR1, Integrina a, LYPD3, MUC1, NECTIN4, NOTCH3, PTLC7, SLC34A2, SLITRK6, STEAP1,

TACSTD2, TPBG, TIM-1, GD2 e receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

[0018] Em algumas formas de realização, o alvo é selecionado no grupo que consiste em EGFR, c-KIT, cMET, HER2, HER3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IGF-IR, P53, PDGFRa, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, CA-IX, aavbb3, aa5bb1, MUC16, antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno de membrana específico da próstata, antígenos de testículos de câncer (CT) (por exemplo, NY-ESO-1, MAGE-A3, MAGE-A1), mesotelina, EpCAM, integrina α6β4, CEACAM6, integrina α3β1, integrina αvβ3, PD-L1, AXL, CDH6, DLL3, EDNRB, EFNA4, NEPP3, EPHA2, FOLR1, LewisY, GPNMB, GUCY2C, HAVCR1, Integrina a, LYPD3, MUC1, NECTIN4, NOTCH3 PTK SLC39A6, SLC44A4, SLITRK6, STEAP1, TACSTD2, TPBG, TIM-1, GD2 e receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

[0019] Em algumas formas de realização, o alvo é VEGFR2, EGER, CEA, HER2 ou HER3.

[0020] Em algumas formas de realização, o alvo é VEGFR2. Em algumas formas de realização, o alvo é EGFR.

[0021] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende uma região determinante de complementaridade 1 (CDR1) selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28, 31 e 34; uma CDR2 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 29, 32 e 35; e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30, 33 e 36. Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente em um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28, 31 e 34; uma CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29, 32 e 35; e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID

NOs: 30, 33 e 36. Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste em um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28, 31 e 34; uma CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29, 32 e 35; e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30, 33 e 36.

[0022] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (3VGR19). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (3VGR19). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (3VGR19).

[0023] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (4VGR17). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (4VGR17). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (4VGR17). Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (4VGR38). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (4VGR38). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (4VGR38).

[0024] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 37 e 40, uma CDR2

selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38 e 41 e uma CDR3 selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 39 e 42. Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente em um CDR1 selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 37 e 40, em uma CDR2 selecionada no grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38 e 41 e em uma CDR3 selecionada a partir de o grupo constituído pelas SEQ ID NOs: 39 e 42. Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste em um CDR1 selecionado no grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 37 e 40, em um CDR2 selecionado no grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38 e 41 e em uma CDR3 selecionada no grupo que consiste em SEQ ID NOs: 39 e 42.

[0025] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 (VHH122). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 (VHH122). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26 (VHH122). Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 (7D12). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 (7D12). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 (7D12).

[0026] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 199, 202 e 205; uma CDR2

selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 200, 203 e 206; e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 201, 204 e 207. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente em um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 199, 202 e 205; uma CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 200, 203 e 206; e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 201, 204 e 207. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional consiste em um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 199, 202 e 205; uma CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 200, 203 e 206; e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 201, 204 e 207.

[0027] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 (2D3). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 (2D3). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 (2D3). Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 (5F7). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 (5F7). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 (5F7). Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 (47D5). Em alguns aspectos, o

sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 (47D5). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 (47D5).

[0028] Em algumas formas de realização, o sdAb ou variante funcional do mesmo compreende uma CDR1 da SEQ ID NO: 208, uma CDR2 da SEQ ID NO: 209 e uma CDR3 da SEQ ID NO: 210. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente em uma CDR1 da SEQ ID NO: 208, uma CDR2 da SEQ ID NO: 209 e uma CDR3 da SEQ ID NO: 210. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional consiste em um CDR1 da SEQ ID NO: 208, uma CDR2 da SEQ ID NO: 209 e uma CDR3 da SEQ ID NO: 210.

[0029] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 75 (BCD090-M2). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 (BCD090-M2). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 75 (BCD090-M2).

[0030] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 211 e 214, um CDR2 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 212 e 215 e um CDR3 selecionado do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 213 e 216. Em algumas formas de realização, o sdAb ou variante funcional do mesmo consiste essencialmente em uma CDR1 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 211

e 214, em uma CDR2 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 212 e 215 e em uma CDR3 selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 213 e 216. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional consiste em um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 211 e 214, em um CDR2 selecionado no grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 212 e 215 e em uma CDR3 selecionada da grupo que consiste em SEQ ID NOs: 213 e 216.

[0031] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 77 (ABS29544.1). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 (ABS29544.1). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 77 (ABS29544.1). Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 79 (NbCEA5). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 (NbCEA5). Em alguns aspectos, o sdAb ou sua variante funcional consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 79 (NbCEA5).

[0032] Em algumas formas de realização, pelo menos um ligante peptídico está presente e compreende a sequência de aminoácidos (GGGGS)n (SEQ ID NO: 1), em que n é 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Em algumas formas de realização, pelo menos um ligante peptídico está presente e compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5. Em algumas formas de realização, pelo menos um ligante

peptídico está presente e compreende a sequência de aminoácidos (GGGGS) 3 (SEQ ID NO: 188).

[0033] Em algumas formas de realização, a proteína CD ou sua variante funcional é uma proteína CD bacteriana ou uma sua variante funcional ou uma proteína CD de levedura ou uma sua variante funcional.

[0034] Em algumas formas de realização, a proteína CD ou sua variante funcional compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 21, 22, 186 e 187. Em alguns aspectos, a proteína CD ou sua variante funcional consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 21, 22, 186 e 187. Em alguns aspectos, a proteína CD ou sua variante funcional consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 21, 22, 186 e 187. Em alguns aspectos, o CD compreende, consiste essencialmente em, ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22. Em alguns aspectos, o CD compreende, consiste essencialmente em, ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 187.

[0035] Em algumas formas de realização, a proteína CD ou sua variante funcional compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica, pelo menos 91% idêntica, pelo menos 92% idêntica, pelo menos 93% idêntica, pelo menos 93% idêntica, pelo menos 94% idêntica, pelo menos 95% idêntico, pelo menos 96% idêntica, pelo menos 97% idêntica, pelo menos 98% idêntica, pelo menos 99% idêntica ou 100% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NOs: 21, 22, 186 ou 187.

[0036] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende uma variante funcional de uma proteína CD com a sequência de aminoácidos inicial da SEQ ID NO: 21 ou 22, em que a variante funcional compreende pelo menos uma mutação em comparação com a sequência inicial selecionada do grupo que consiste em Y84A, Y84H, T85D, T86E, M92N, M92A, M92K, M92Q, V128A, V128T, V129A, V129L, V129I, V129T, V130A e V130T. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende uma variante funcional de uma proteína CD com a sequência de aminoácidos inicial da SEQ ID NO: 186 ou 187, em que a variante funcional compreende pelo menos uma mutação em comparação com a sequência inicial selecionada do grupo que consiste em Y85A, Y85H, T86D, T87E, M93N, M93A, M93K, M93Q, V129A, V129T, V130A, V130L, V130I, V130T, V131A e V131T.

[0037] Em algumas formas de realização, a variante funcional de CD compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 22, 187, 189, 190, 191, 192, 193 e 194. Em algumas formas de realização, a variante funcional de CD consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 22, 187, 189, 190, 191, 192, 193 e 194. Em algumas formas de realização, a variante funcional de CD consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 22, 187, 189, 190, 191, 192, 193 e 194.

[0038] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende um sdAb anti-VEGFR2 ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional do mesmo. Em alguns aspectos dessas formas de realização, a proteína de fusão compreende uma

sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 7 sem uma marcação HIS (isto é, aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 7), SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 9 sem um marcador HIS (isto é, aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 9), SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 11 sem um marcador HIS (isto é, aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 11).

[0039] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende um sdAb anti-EGFR ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou variante funcional da mesma. Em alguns aspectos dessas formas de realização, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 13 sem um marcador HIS (isto é, aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 13), SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 15 sem um marcador HIS (isto é, aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 15), SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 17 sem um marcador HIS (isto é, aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 17, isto é SEQ ID NO: 19).

[0040] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende um sdAb anti-HER2 ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou variante funcional da mesma. Em alguns aspectos dessas formas de realização, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 72 sem um marcador HIS (ou seja, aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 72), SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 73 sem um marcador HIS (isto é, aminoácidos 1-291 da SEQ ID NO: 73), SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 74 sem um marcador HIS (isto é, aminoácidos 1-292 da SEQ ID NO: 74).

[0041] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende um sdAb anti-HER3 ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou variante funcional da mesma. Em alguns aspectos dessas formas de realização, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 76 sem um marcador HIS (isto é, aminoácidos 1-300 da SEQ ID NO: 76).

[0042] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende um sdAb anti-CEA ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional da mesma. Em alguns aspectos dessas formas de realização, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 78 sem um marcador HIS (ou seja, aminoácidos 1-293 da SEQ ID NO: 78), SEQ ID NO: 80 e SEQ ID NO: 80 sem um marcador HIS (isto é, aminoácidos 1-296 da SEQ ID NO: 80).

[0043] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende um sdAb desimunizado (por exemplo, uma variante funcional de sdAb com uma ou mais mutações desimunizantes) e/ou um CD desimunizado (por exemplo, uma variante funcional de CD com um ou mais desimunização de mutações). Por exemplo, em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende pelo menos uma mutação desimunizadora em pelo menos um epítopo de célula T selecionado do grupo que consiste no epítopo 1 (SEQ ID NO: 63), epítopo 2 (SEQ ID NO: 64), Epítopo 3 (SEQ ID NO: 65), epítopo 4 (SEQ ID NO: 66), epítopo 5 (SEQ ID NO: 67) e epítopo 6 (SEQ ID NO: 68). Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende uma sequência de

aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 93-185. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos selecionada das SEQ ID NOs: 93-185. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 93-185.

[0044] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende os aminoácidos 1-297 de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 93-181. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente nos aminoácidos 1-297 de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 93-181. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste nos aminoácidos 1-297 de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 93-181.

[0045] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 182-185.

[0046] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

[0047] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente em uma sequência

de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 19, 182, 183, 184 e 185.

[0048] Em alguns aspectos, a revelação se refere a uma composição farmacêutica ou formulação farmacêutica compreendendo pelo menos uma proteína de fusão da revelação. Em alguns aspectos, a composição farmacêutica ou formulação farmacêutica compreende pelo menos uma proteína de fusão da revelação e pelo menos um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

[0049] Em alguns aspectos, a revelação se refere a um método de tratamento de câncer em um indivíduo em necessidade do mesmo, o método compreendendo a administração ao indivíduo e quantidade eficaz de pelo menos uma proteína de fusão ou composição farmacêutica da revelação. Em algumas formas de realização, a pelo menos uma proteína de fusão ou a composição farmacêutica é administrada parenteralmente.

[0050] Em algumas formas de realização, o método de tratamento de câncer em um indivíduo em necessidade do mesmo compreende ainda administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um substrato para a citosina-desaminase. Em algumas formas de realização, o substrato compreende um pró-fármaco de 5-fluoruracila. Em algumas formas de realização, o pró-fármaco do 5-fluoruracila é selecionado do grupo que consiste em 5-fluorcitosina (5-FC), Toca FC, análogos do 5-FC e compostos fotoativáveis, sais ou ésteres. Em algumas formas de realização, o pró-fármaco administrado ao indivíduo é 5-FC.

[0051] Em algumas formas de realização, o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de cólon,

câncer de estômago, câncer de pâncreas, câncer de mama, carcinoma basocelular, doença de Bowen, câncer cervical, neoplasia escamosa da superfície ocular, melanoma, carcinoma de células renais, câncer de pulmão, bexiga câncer, câncer de vesícula biliar, câncer de laringe, câncer de fígado, câncer de tireoide, câncer de glândula salivar, câncer de próstata, câncer colorretal, câncer de cabeça e pescoço, colangiocarcinoma, câncer de esôfago, câncer de osso, câncer de endométrio, câncer de ovário, sarcoma de tecidos moles e Merkel carcinoma celular. Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor sólido. Em algumas formas de realização, o tumor sólido é câncer de cólon, câncer colorretal, câncer de pâncreas ou câncer de cabeça e pescoço.

[0052] Em alguns aspectos, a revelação se refere a uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão de qualquer uma das formas de realização precedentes.

[0053] Em alguns aspectos, a revelação se refere a uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico otimizada por códon que codifica um sdAb ou uma variante funcional do mesmo de qualquer proteína de fusão de qualquer uma das formas de realização precedentes. Em alguns aspectos, a revelação se refere a uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico otimizada por códon que codifica um CD ou uma variante funcional do mesmo de qualquer proteína de fusão de qualquer uma das formas de realização precedentes.

[0054] Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 8. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 10. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 12. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 14. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 16. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 18. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 20. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 195. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 196. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 197. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 198.

[0055] Em alguns aspectos, a revelação se refere a um vetor compreendendo um ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão de qualquer uma das formas de realização precedentes.

[0056] Em alguns aspectos, a revelação se refere a uma célula hospedeira compreendendo um vetor ou ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão de qualquer uma das formas de realização precedentes.

[0057] Em alguns aspectos, a revelação se refere a um método de produção de uma proteína de fusão de acordo com qualquer uma das formas de realização precedentes, o método compreendendo expressão de um ácido nucleico que codifica a proteína de fusão em uma célula hospedeira. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é projetada para melhorar a atividade, produção citoplasmática e/ou estabilidade de proteínas com ligações dissulfeto.

[0058] Em algumas formas de realização, o método revelado de produção de uma proteína de fusão produz uma proteína de fusão com ligações dissulfeto para as quais a atividade, produção citoplasmática e/ou estabilidade da proteína de fusão é aumentada por uma quantidade selecionada de 2 a 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes e 100 vezes em comparação com a proteína de fusão produzida por uma versão não projetada da mesma célula hospedeira.

[0059] Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma célula de não mamífero. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma célula de levedura ou uma célula bacteriana. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma célula de *E. coli*, uma célula Archaebacterial ou uma célula Actinobacterial. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma cepa de *E. coli* que fornece um ambiente citoplasmático para a formação de ligações dissulfeto. Em alguns aspectos, o ambiente

citoplasmático é alcançado otimizando a via da tioredoxina e/ou glutationa e/ou expressando a isomerase da ligação dissulfeto citosólica. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma cepa de *E. c*oli que expressa constitutivamente uma cópia cromossômica de uma isomerase de ligação dissulfeto citosólica. Em alguns aspectos dessas formas de realização, a ligação dissulfeto citosólica isomerase é DsbC. Em alguns aspectos, a cepa de E. coli é SHuffle® T7, SHuffle® T7 Express, SHuffle® Express, Origami™ ou Rosetta-gami™.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0060] Os desenhos representam apenas exemplos de formas de realização da presente revelação e, portanto, não limitam seu escopo.

[0061] A figura 1A mostra o design da proteína de uma proteína de fusão CD-CD-anticorpo completo. A figura 1B mostra o desenho da proteína e o perfil de expressão de uma proteína de fusão CD-anticorpo completo expressa em células de mamíferos.

[0062] A figura 2A mostra o desenho vetorial de uma proteína de fusão CD de domínio de alvejamento do antígeno. A figura 2B resume o perfil de expressão e os resultados da análise funcional das proteínas de fusão testadas; v = verificada; N/D = Não detectada; N/A = Não disponível. A figura 2C e figura 2D mostram o perfil de expressão de várias proteínas de fusão VHH-CD da revelação. I0: Cultura de *E. coli* antes da indução. I5: Cultura de *E. coli* 5 horas após a indução. Citosol (C): a fração solúvel do lisado celular. Corpo de inclusão (I): a fração insolúvel do lisado celular. M: Marcador.

[0063] A figura 3 mostra uma análise SDS-PAGE de várias proteínas de fusão sdAb-CD a partir da purificação em pequena escala. M = Marcador.

[0064] A figura 4A e figura 4B mostram análise por cromatografia de exclusão por tamanho de várias proteínas de fusão sdAb-CD.

[0065] A figura 5A e figura 5B mostram a atividade da citosina desaminase (CDase) de várias proteínas de fusão sdAb-CD.

[0066] A figura 6A e figura 6B mostram ensaios de ELISA demonstrando a capacidade de ligação de proteínas de fusão sdAb-CD a VEGFR2 humano e EGFR humano (figura 6A) e HER2, HER3 e CEA humano (figura 6B). OD = densidade óptica.

[0067] A figura 7A e figura 7B mostram o perfil de purificação da purificação em larga escala das proteínas de fusão adAb-CD 3VGR19-CD-H (figura 7A) e 7D12-CDome3 (figura7B). LS = sobrenadante de baixa velocidade; F1 = fluxo através de 1 da coluna Ni Sepharose; F2 = fluxo através de 2 da coluna Ni-Sepharose; M = marcador; Ql = 1ª coluna Q-Sepharose; Q2 = 2ª coluna Q-Sepharose; QF1 = fluxo através da 1ª coluna Q-Sepharose; QF2 = fluxo através da 2ª coluna Q-Sepharose; X1 = fração 1; X2 = fração 2.

[0068] A figura 8 mostra o perfil de expressão das proteínas de fusão sdAb-CD (3VGR19-CD) nas células SHuffle® T7 Express e T7 Express. S = sobrenadante (citosol); P = esfera (corpo de inclusão); M = marcador; I_0 = cultura de *E. coli* antes da indução; I_5 = cultura de *E. coli* 5 horas após a indução. A banda correspondente à proteína de fusão é indicada com uma seta.

[0069] A figura 9A (MDA-MB-231) e figura 9B (A431) mostram os resultados de ensaios citotóxicos com bases em células com várias proteínas de fusão da revelação em células que expressam antígenos.

[0070] A figura 10A mostra os resultados de ensaios citotóxicos com base em células com as proteínas de fusão CDoem3-H e 7Dl2-CDoem3-H em células que expressam EGFR. A figura 10B mostra os resultados de ensaios citotóxicos com base em células com as proteínas de fusão CDoem3 e 7Dl2-CDoem3 em células que expressam EGFR. NP = controle negativo de proteína (CDoem3-H).

[0071] A figura 11A mostra a curva de crescimento tumoral do modelo de xenoenxerto A431 após tratamento com 7Dl2-CDoem3-H e 7Dl2-CDoem3 em combinação com 5-fluorcitosina (5-FC); a figura 11B mostra o peso do tumor do modelo de xenoenxerto A431 após o tratamento com 7Dl2-CDoem3-H e 7Dl2-CDoem3 em combinação com 5-FC.

[0072] A figura 12 mostra o perfil de expressão e os resultados da análise funcional para variantes de mutação única de 7D12-CDoem3-H.

[0073] A figura 13A uma figura 13B mostram o perfil de expressão e resultados de análise funcional de variantes de multi-mutação de 7Dl2-CDoem3-H.

[0074] A figura 14 mostra um resumo da proliferação de células T e respostas de IL-2 ELISpot das variantes 7Dl2-CDoem3 e 7Dl2-CDoem3.

[0075] A figura 15 mostra a atividade da citosina desaminase e a capacidade de ligação das variantes 7Dl2-CDoem3 e 7Dl2-CDoem3 ao EGFR humano.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0076] A revelação fornece proteínas de fusão de função dupla compreendendo um anticorpo de domínio único (sdAb) ou uma variante funcional do mesmo com uma citosina desaminase (CD) ou uma variante funcional do mesmo. As proteínas de fusão são produzidas utilizando os métodos descritos no presente documento com boa atividade biológica e rendimentos superiores (por exemplo, cerca de 1 g/L), passíveis de uso comercial. As proteínas de fusão da revelação podem ser expressas em altos rendimentos como proteínas citosólicas em *E. coli*, e a estabilidade da proteína pode ser melhorada ainda mais em uma cepa de *E. coli* que foi projetada para otimizar a formação de ligações dissulfeto no citoplasma. Também são fornecidas no presente documento composições e métodos de uso das proteínas de fusão da revelação no tratamento de câncer e outras doenças proliferativas.

[0077] A revelação demonstra que várias proteínas de fusão sdAb-CD de acordo com a revelação são estáveis e têm efeitos citotóxicos nas células cancerígenas. As proteínas solúveis foram detectadas por SDS-PAGE e a alta pureza relativa das proteínas de fusão é mostrada por SEC-HPLC. As porções CD e sdAb das proteínas de fusão mantiveram sua função original em todas as proteínas de fusão produzidas. A atividade da CD foi demonstrada por um ensaio de conversão de 5-FC-a-5-FU e a ligação das proteínas de fusão ao VEGFR2, EGFR, HER3, HER2 ou CEA humano foi demonstrada por ELISA. Através de testes de citotoxicidade em linhas de células cancerígenas, as proteínas de fusão sdAb-CD provaram sua capacidade de direcionar e ligar VEGFR2 e EGFR e converter 5-FC não

tóxico em 5-FU tóxico, matando assim as células cancerígenas que expressam antígeno. No modelo de xenoenxerto de camundongos A431, as proteínas de fusão sdAb-CD provaram ser funcionais inibindo e suprimindo o crescimento tumoral.

[0078] A expressão de várias proteínas de fusão da revelação utilizando os métodos descritos no presente documento resultou em proteínas de fusão com boa atividade biológica e rendimentos superiores (por exemplo, cerca de 1 g/L), passíveis de uso comercial.

[0079] A revelação também fornece proteínas de fusão sdAb-CD desimunizadas que são estáveis para produção e que demonstraram atividade de CD e atividade de ligação ao antígeno.

[0080] A menos que seja especificamente declarado ou óbvio a partir do contexto, como usado no presente documento, o termo "ou" é entendido como inclusivo. A menos que seja especificamente declarado ou óbvio no contexto, conforme usado no presente documento, os termos "um", "uma" e "o, a" são entendidos como singulares ou plurais.

[0081] Além disso, "e/ou", quando usado no presente documento, deve ser tomado como revelação específica de cada um dos dois recursos ou componentes especificados, com ou sem o outro. Assim, o termo "e/ou", usado em uma frase como "A e/ou B" neste documento, pretende incluir "A e B", "A ou B", "A" (sozinho) e "B" (sozinho).

[0082] A menos que seja especificamente declarado ou óbvio do contexto, como usado no presente documento, o termo "sobre" é entendido como dentro de uma faixa de

tolerância normal na técnica, por exemplo, dentro de dois desvios padrão da média (por exemplo, o valor declarado). "Cerca de" pode ser entendido como 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% ou 0,01% do valor declarado. Salvo disposição em contrário do contexto, todos os valores numéricos aqui fornecidos são modificados pelo termo “cerca de”.

[0083] Quaisquer composições ou métodos fornecidos no presente documento podem ser combinados com uma ou mais de qualquer uma das outras composições e métodos fornecidos no presente documento.

[0084] A "atividade" de uma enzima é uma medida de sua capacidade de catalisar uma reação, isto é, "funcionar" e pode ser expressa como a taxa na qual o produto da reação é produzido. Por exemplo, a atividade enzimática pode ser representada como a quantidade de produto produzido por unidade de tempo ou por unidade de enzima (por exemplo, concentração ou peso) ou em termos de constantes de afinidade ou dissociação. Como usado de forma intercambiável neste documento, uma "atividade de citosina desaminase", "atividade biológica de citosina desaminase" ou "atividade funcional de uma citosina desaminase" se refere a uma atividade exercida por CD ou uma sua variante funcional ou por uma proteína de fusão da revelação, em um substrato CD, conforme determinado in vivo ou in vitro, de acordo com técnicas padrão. Os ensaios para medir a atividade da CD são conhecidos na técnica. Por exemplo, a atividade da CD pode ser medida determinando a taxa de conversão de 5-FC em 5-FU ou citosina em uracila. A detecção de 5-FC, 5-FU, citosina e uracila pode ser

realizada pelos métodos descritos na seção Exemplos, por cromatografia e/ou por outros métodos conhecidos na técnica.

[0085] Nesta revelação, “consistindo essencialmente em" ou "consiste essencialmente em" permite a presença de mais do que aquilo que é citado, desde que as características básicas ou novas do que é citado não sejam alteradas pela presença de mais do que aquilo que é citado. é citado, mas exclui formas de realização da técnica anterior. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeo/proteína ou ácido nucleico que "consiste essencialmente em" uma sequência citada pode incluir um ou mais aminoácidos ou ácidos nucleicos adicionais, respectivamente, que não destroem a atividade biológica da sequência citada.

[0086] Como utilizado no presente documento, "polipeptídeo de fusão" ou "proteína de fusão" se refere a uma proteína compreendendo dois ou mais polipeptídeos diferentes ou fragmentos ativos dos mesmos que não estão naturalmente presentes na mesma proteína. Uma proteína de fusão tem um único esqueleto de polipeptídeo contíguo, opcionalmente com um ligante peptídico entre qualquer um dos dois ou mais polipeptídeos diferentes. As proteínas de fusão podem ser preparadas usando técnicas convencionais em biologia molecular para unir os dois ou mais genes na estrutura em uma única sequência de ácido nucleico e, em seguida, expressar o ácido nucleico em uma célula hospedeira apropriada em condições nas quais a proteína de fusão é produzida.

[0087] Como usado neste documento, "variante funcional" se refere a uma variante de um polipeptídeo ou proteína possuindo identidade de sequência substancial ou significativa ao polipeptídeo ou proteína e mantendo pelo menos uma das atividades biológicas do polipeptídeo ou proteína. Uma variante funcional de um polipeptídeo ou proteína pode ser preparada por meios conhecidos na técnica, tendo em vista a presente revelação. Uma variante funcional pode incluir uma ou mais modificações na sequência de aminoácidos do polipeptídeo ou proteína. Em algumas formas de realização, as modificações alteram uma ou mais propriedades físico-químicas do polipeptídeo ou proteína, por exemplo, melhorando a estabilidade térmica do polipeptídeo ou proteína, alterando a especificidade do substrato, alterando o pH ideal, reduzindo a imunogenicidade e similares. Em algumas formas de realização, as modificações alteram uma ou mais das atividades biológicas do polipeptídeo ou proteína, desde que não destruam ou abolam todas as atividades biológicas do polipeptídeo ou proteína.

[0088] De acordo com algumas formas de realização da invenção, uma variante funcional de um polipeptídeo ou proteína compreende uma ou mais de uma substituição de aminoácidos, preferencialmente uma substituição conservadora de aminoácidos, ao polipeptídeo ou proteína que não afeta significativamente a atividade biológica do polipeptídeo ou proteína. As substituições conservadoras de aminoácidos incluem, mas não estão limitadas às substituições de aminoácidos dentro do grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), substituições de

aminoácidos com o grupo de aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), amino substituições de ácidos no grupo de aminoácidos polares (glutamina e asparagina), substituições de aminoácidos no grupo de aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina e valina), substituições de aminoácidos no grupo de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) e substituições de aminoácidos dentro do grupo de pequenos aminoácidos (glicina, alanina, serina, treoina e metionina). Aminoácidos não padrão ou não naturais (como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil-lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina e alfa-metil-serina) também podem ser usados ou alternativamente para substituir resíduos de aminoácidos padrão em um polipeptídeo ou proteína.

[0089] De acordo com algumas formas de realização da invenção, uma variante funcional de um polipeptídeo ou proteína compreende uma deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo ou proteína. Por exemplo, uma variante funcional do CD pode incluir uma exclusão e/ou inserção de 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 ou mais aminoácidos no CD. Por exemplo, uma variante funcional de um sdAb pode incluir uma exclusão e/ou inserção de 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, ou mais aminoácidos para o sdAb. Em algumas formas de realização, uma variante funcional de um sdAb pode incluir uma exclusão e/ou inserção de 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 ou mais aminoácidos para a

região estrutural (FR) do sdAb. Em algumas formas de realização, a variante funcional de um polipeptídeo ou proteína compreende uma deleção da primeira metionina.

[0090] De acordo com algumas formas de realização da invenção, uma variante funcional de um polipeptídeo ou proteína compreende uma substituição e uma exclusão e/ou inserção na proteína original. Em alguns aspectos, a substituição é uma substituição conservadora e/ou a exclusão e/ou inserção é uma exclusão pequena e/ou inserção pequena.

[0091] Como usado no presente documento, "anticorpo de domínio único", "sdAb", "proteína sdAb", "VHH" (domínio variável do anticorpo de cadeia pesada) e "nanocorpo" são usados de forma intercambiável. Como usado no presente documento, "CD", "CDase" e "proteína CD" são usados de forma intercambiável.

[0092] Os termos "identidade" ou porcentagem "idêntica", no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou polipeptídeos, se referem a duas ou mais sequências ou subsequências iguais ou com uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos iguais, quando comparados e alinhados (introdução de lacunas, se necessário) para a correspondência máxima, sem considerar nenhuma substituição conservadora de aminoácidos como parte da identidade da sequência. O termo "substancialmente idêntico" se refere a duas ou mais sequências ou subsequências que possuem uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos iguais (ou seja, pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, Identidade de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou

superior em uma região especificada, quando comparados e alinhados para obter a correspondência máxima em uma janela de comparação ou região designada) conforme medido usando algoritmos de comparação de sequência BLAST ou BLAST 2.0 com os parâmetros padrão descritos abaixo, ou por alinhamento manual e inspeção visual. A definição inclui sequências que possuem exclusões e/ou adições, bem como aquelas que têm substituições. Conforme descrito abaixo, os algoritmos podem dar conta de lacunas e similares. Quando não especificado, a identidade ou identidade substancial é determinada por todo o comprimento da sequência de referência. Quando especificada, a identidade pode ser determinada em uma região que tem pelo menos cerca de 10 aminoácidos ou nucleotídeos de comprimento, pelo menos cerca de 25 aminoácidos ou nucleotídeos de comprimento ou em uma região com 50 a 100 aminoácidos ou nucleotídeos de comprimento.

[0093] A porcentagem de identidade pode ser medida usando software ou algoritmos de comparação de sequência ou por inspeção visual. Vários algoritmos e software são conhecidos na técnica que podem ser usados para obter alinhamentos de sequências de aminoácidos ou nucleotídeos {vide, por exemplo Karlin e outros, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-2268, como modificado em Karlin e outros, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877) e incorporada nos programas NBLAST e XBLAST (Altschul e outros, 1991, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402). Em determinadas formas de realização, o Gapped BLAST pode ser usado como descrito em Altschul e outros, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2

(Altschul e outros, 1996, Methods in Enzymology, 266: 460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Califórnia) ou MegAlign (DNASTAR).

[0094] O termo "isolado", quando usado para descrever uma proteína ou ácido nucleico, se refere a uma molécula substancialmente livre de outros elementos presentes em seu ambiente natural. Por exemplo, uma proteína isolada está substancialmente livre de material celular ou outras proteínas da célula ou fonte de tecido da qual é derivada. O termo "isolado" também se refere a preparações em que a proteína isolada é suficientemente pura para ser administrada como uma composição farmacêutica, ou pelo menos 70-80% (p/p) pura, mais preferencialmente, pelo menos 80-90% (p/p) puro, ainda mais preferencialmente, 90-95% puro; e, mais preferencialmente, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% (p/p) puro.

[0095] Conforme usado no presente documento, "referência" no contexto de dados de comparação se refere a um padrão de comparação.

[0096] Como usado no presente documento, "liga-se especificamente" se refere a um agente (por exemplo, sdAb ou sua variante funcional) que reconhece e liga uma molécula (por exemplo, VEGFR2, EGFR), mas que não reconhece e liga substancialmente outras moléculas em uma amostra, por exemplo, outras moléculas em uma amostra biológica. Por exemplo, duas moléculas que se ligam especificamente formam um complexo que é relativamente estável em condições fisiológicas. A ligação específica é caracterizada por uma alta afinidade e um número baixo a moderado de locais de ligação, diferentemente da ligação não específica, que

geralmente tem uma baixa afinidade com um número moderado a alto de locais de ligação. Conforme usado neste documento, o termo "se liga especificamente a" ou é "específico para" se refere a interações mensuráveis e reproduzíveis, como a ligação entre um alvo e um anticorpo (por exemplo, sdAb ou sua variante funcional), que é determinante da presença do alvo na presença de uma população heterogênea de moléculas que induzem moléculas biológicas. Por exemplo, um sdAb ou uma variante funcional do mesmo que se liga especificamente a um alvo (que pode ser um epítopo) é um sdAb ou uma variante funcional do mesmo que liga esse alvo com maior afinidade, avidez, mais prontamente e/ou com maior duração do que ele liga-se a outros destinos. Em algumas formas de realização, a extensão da ligação de um sdAb ou de sua variante funcional a um alvo não relacionado é inferior a cerca de 10% da ligação do sdAb ou de sua variante funcional ao alvo, conforme medido, por exemplo, por um radioimunoensaio (RIA). Em determinadas formas de realização, um sdAb ou uma variante funcional do mesmo que se liga especificamente a um alvo tem uma constante de dissociação de (KD) de $<1x10^{-6}$ M, $<lxl0^{-7}$M, $<lxl0^{-8}$ M, $<1x10^{-9}$ M, ou $<lxl0^{-10}$ M, $<1x10^{-11}$ M, $<lxl0^{-12}$ M. Em determinadas formas de realização, um sdAb ou uma variante funcional do mesmo se liga especificamente a um epítopo de uma proteína que é conservada entre a proteína de diferentes espécies. Em algumas formas de realização, a ligação específica pode incluir, mas não requer, ligação exclusiva (isto é, pode se ligar a apenas uma proteína).

[0097] Conforme usado no presente documento, "indivíduo" se refere a um mamífero, incluindo, mas não

limitado ao mamífero humano ou não humano, como bovinos, equinos, caninos, ovinos ou felinos.

[0098] As faixas fornecidas no presente documento são entendidas como atalhos e, portanto, abrangem todos os valores dentro do intervalo. Por exemplo, entende-se que um intervalo de 1 a 50 inclui qualquer número, combinação de números ou subintervalo escolhido entre 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, incluindo não números inteiros.

[0099] O termo "tumor" ou "neoplasia" se refere a uma massa anormal de tecido contendo células neoplásicas. Neoplasias e tumores podem ser benignos, pré-malignos ou malignos.

[00100] O termo "câncer" ou "neoplasia maligna" se refere a uma célula que exibe crescimento descontrolado, invasão de tecidos adjacentes e, muitas vezes, metástase para outros locais do corpo. Isso inclui cânceres hematológicos e linfoides.

[00101] O termo "afinidade de ligação" geralmente se refere à força da soma total de interações não covalentes entre um único local de ligação de uma molécula (por exemplo, de um sdAb) e seu parceiro de ligação (por exemplo, um antígeno). Salvo indicação em contrário, conforme usado no presente documento, "afinidade de ligação", "se ligam a", "se liga a" ou "ligação a" se refere a uma afinidade de ligação intrínseca que reflete uma interação 1:1 entre membros de um par de ligação (por exemplo, anticorpo Fab e antígeno). A afinidade de uma

molécula X para seu parceiro Y pode geralmente ser representada pela constante de dissociação (KD). A afinidade pode ser medida por métodos comuns conhecidos na técnica, incluindo os descritos no presente documento. Os anticorpos de baixa afinidade geralmente se ligam ao antígeno lentamente e tendem a se dissociar rapidamente, enquanto os anticorpos de alta afinidade geralmente se ligam ao antígeno mais rapidamente e tendem a permanecer mais tempo ligados. A arte apresenta uma variedade de métodos para medir a afinidade de ligação, qualquer um dos quais pode ser utilizado para os fins da presente invenção. Formas de realização ilustrativas e exemplares específicas para medir a afinidade de ligação, por exemplo, força de ligação são descritas a seguir.

[00102] Várias publicações, artigos e patentes são citadas ou descritas em segundo plano e em toda o relatório descritivo; cada uma dessas referências sendo incorporada ao presente documento como referência em sua totalidade. A discussão de documentos, atos, materiais, dispositivos, artigos ou similares que foram incluídos na presente especificação é com o objetivo de fornecer contexto para a invenção. Essa discussão não é uma admissão de que algum ou todos esses assuntos façam parte da técnica anterior com relação a quaisquer invenções reveladas ou reivindicadas.

[00103] A revelação fornece proteínas de fusão compreendendo a fórmula (I) ou a fórmula (II):

N-(L) n-C (fórmula I);

C-(L) n-N (fórmula II);

em que N é um anticorpo de domínio único (sdAb) ou uma variante funcional do mesmo, L é um ligante peptídico en = 0-50 e C é uma proteína da citosina desaminase (CD) ou uma variante funcional do mesmo. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente na fórmula I. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste na fórmula I. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente na fórmula II. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste na fórmula II.

[00104] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende a fórmula I, de modo que o terminal C do ligante peptídico ou o terminal C do sdAb ou sua variante funcional seja fundido ao terminal N da proteína CD ou sua variante funcional. Por exemplo, em alguns aspectos, o ligante peptídico não está presente e o terminal C do sdAb ou sua variante funcional é fundido ao terminal N da proteína CD ou sua variante funcional. Em alguns aspectos, o ligante peptídico está presente e o terminal C do sdAb ou sua variante funcional é fundido ao terminal N do ligante peptídico, e o terminal C do ligante peptídico é fundido ao terminal N de a proteína CD ou sua variante funcional.

[00105] Em outras formas de realização, a proteína de fusão compreende a fórmula II, de modo que o terminal C do ligante peptídico ou o terminal C da proteína CD ou sua variante funcional seja fundido ao terminal N do sdAb ou sua variante funcional. Por exemplo, em alguns aspectos, o ligante peptídico não está presente e o terminal C da proteína CD ou sua variante funcional é

fundido ao terminal N do sdAb ou sua variante funcional. Em alguns aspectos, o ligante peptídico está presente e o terminal C da proteína CD ou sua variante funcional é fundido ao terminal N do ligante peptídico, e o terminal C do ligante peptídico é fundido ao Terminal N do sdAb ou sua variante funcional.

ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO EXEMPLARES DE PROTEÍNAS DE FUSÃO DA REVELAÇÃO

[00106] Um sdAb compreende uma cadeia única com um único domínio variável com três regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Anticorpos de domínio único compreendem tradicionalmente os fragmentos variáveis de anticorpos apenas de cadeia pesada de Camelídeo (HcAbs), isto é, o domínio variável da cadeia pesada de anticorpos de cadeia pesada, VHH. Alguns polipeptídeos VHH também são denominados comercialmente como Nanobody® (Nb; Ablynx). No entanto, nesta revelação, o uso do termo nanocorpo não limita o anticorpo de domínio único a um Nanobody® fornecido pela Ablynx. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é selecionado a partir de apenas anticorpos da classe IgG da cadeia pesada de camelos, alpacas ou lhamas. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é um polipeptídeo manipulado gerado por enxerto de CDR. Por exemplo, o sdAb ou sua variante funcional é gerado substituindo toda ou parte da região CDR dos sdAbs derivados de camelídeos pela região CDR de outros anticorpos conhecidos com alvos desejados. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é um derivado recombinante de anticorpos somente de cadeia

pesada encontrados em tubarões. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é gerado sinteticamente usando técnicas que são bem conhecidas na arte. Em determinadas formas de realização, um sdAb ou uma variante funcional do mesmo é um sdAb humano (Domantis, Inc., Waltham, Mass. vide, por exemplo, Patente US número 6.248.516 B1).

[00107] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é um VHH humanizado de um Camelídeo. Como usado no presente documento, o termo sdAb "humanizado" significa um sdAb que teve um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos da sequência VHH de ocorrência natural substituída por um ou mais resíduos de aminoácidos que ocorrem na posição correspondente em um VH de um anticorpo convencional de quatro cadeias de um ser humano. Esta substituição pode ser realizada por métodos que são bem conhecidos na arte. Por exemplo, as regiões de estrutura (FRs) dos sdAbs podem ser substituídas por FRs variáveis humanas.

[00108] As CDRs são de importância primordial para o reconhecimento de epítopos de um sdAb ou de sua variante funcional. Podem ser feitas alterações nos resíduos de aminoácidos que compõem as CDRs sem interferir com a capacidade do sdAb ou sua variante funcional de reconhecer e ligar seu epítopo cognato. Por exemplo, podem ser feitas alterações que não afetam o reconhecimento do epítopo alvo, mas aumentam a afinidade de ligação do sdAb ou sua variante funcional para o epítopo. Em algumas formas de realização, essas alterações são substituições

conservadoras de aminoácidos e/ou pequenas deleções ou pequenas inserções.

[00109] Em algumas formas de realização, os sdAbs ou variantes funcionais dos mesmos compreendem o domínio variável de qualquer um de uma classe de anticorpos IgG somente para cadeia pesada. O domínio variável único compreende três regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Um sdAb ou uma variante funcional do mesmo pode ser uma imunoglobulina e/ou polipeptídeo com a estrutura (geral) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, na qual FR1, FR2, FR3 e FR4 se referem às regiões de estrutura 1, 2, 3 e 4, respectivamente, e nas quais CDR1, CDR2 e CDR3 se referem às regiões determinantes de complementaridade 1, 2 e 3, respectivamente. A numeração dos resíduos de aminoácidos de um sdAb ou sua variante funcional está de acordo com a numeração geral para domínios VH dada por Rabat e outros ("Sequência de proteínas de interesse imunológico", US Public Health Services, NIH Bethesda, Md., Publicação No. 91). De acordo com essa numeração, FR1 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 1-30, a região 1 de determinação de complementaridade (CDR1) de um sdAb ou uma variante funcional do mesmo compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 31-35, FR2 de um sdAb ou sua variante funcional compreende os aminoácidos nas posições 36-49, CDR2 de um sdAb ou sua variante funcional compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 50-65, FR3 de um sdAb ou sua variante funcional compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 66-94, CDR3 de um sdAb ou sua variante funcional compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 95-102, e FR4 de um sdAb ou sua

variante funcional compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 103-113.

[00110] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é um sdAb com meia vida prolongada. Os métodos para aumentar a meia-vida dos polipeptídeos são bem conhecidos na técnica.

[00111] A eficácia das proteínas de fusão da presente revelação como agentes terapêuticos depende da seleção de um alvo de sdAb apropriado. O alvo pode ser de qualquer tipo atualmente conhecido ou que se torne conhecido e inclui peptídeos e não peptídeos (por exemplo, lipídios da superfície celular, glicano ou outras modificações pós-traducionais).

[00112] Em algumas formas de realização, os sdAbs ou suas variantes funcionais da revelação se ligam aos alvos extracelulares na superfície das células cancerígenas. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional se liga a um alvo, em que o alvo é selecionado a partir de uma molécula de membrana celular, uma molécula secretada e uma molécula intracelular.

[00113] Em algumas formas de realização, o alvo é selecionado do grupo que consiste em EGFR, 5T4, A33, AFP, beta-catenina, BRCA1, BRCA2, C242, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23, CD30, CD3, CD37, CD40, CD44, CD5, CD51, CD52, CD56, CD64, CD74, CD80, CDCP1, c-KIT, COX-2, cMET, CSF1R, CTEA-4, EGF2, ErbB2, ErbB3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FET3, HER2, HER3, HIF-Ia, HEA-DR, IGF-IR, mTOR, NPC-1C, P53, PDGFRα, PDGFRβ, PLGF, PSA, RGMa, RoN, TNF, TP53, TPD52, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, CA-IX, avβ3, α5β1, FAP, glicoproteína 75, TAG-72, MUC16, NR-LU-13, SLAMF7, EGP40,

BAFF, PRF-3, antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno de membrana específico da próstata, MART-1, gpl00, antígenos de testículo de câncer (CT) (por exemplo, NY-ESO-1, MAGE-A3, MAGE-Al), hTERT, MCC, Mum-1, ERBB2IP, EpCAM, TfR, integrina α6β4, HGFR, PTP-LAR, CD147, CDCP1, CEACAM6, JAM1, integrina aa3bb1, integrina aavbb3, PD-L1, AXL, CDH6, DLL3, EDNRB, EFNA4, NEPP3, EPHA2, FOLR1, LewisY, GPNMB, GUCY2C, HAVCR1, Integrina a, LYPD3, mesotelina, MUC1, NECTIN4, NOTCH3, PTLC7, SLC34A2, SLC34A2, SLC34A2, SLITRK6, STEAP1, TACSTD2, TPBG, TIM-1, GD2 e receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

[00114] Em algumas formas de realização, o alvo é selecionado do grupo que consiste em EGFR, c-KIT, cMET, HER2, HER3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IGF-IR, P53, PDGFRa, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, CA-IX, avβ3, α5β1, MUC16, antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno de membrana específico da próstata, antígenos de testículos de câncer (CT) (por exemplo, NY-ESO-l, MAGE-A3, MAGE-A1), mesotelina, EpCAM, integrina α6β4, CEACAM6, integrina α3β1, integrina αvβ3, PD-L1, AXL, CDH6, DLL3, EDNRB, EFNA4, NEPP3, EPHA2, FOLR1, LewisY, GPNMB, GUCY2C, HAVCR1, Integrina α, LYPD3, MUC1, NECTIN4, NOTCH3, PTK7, SLC34A2, SIT344, STEAP1, TACSTD2, TPBG, TIM-1, GD2 e receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

[00115] Em determinadas formas de realização, o alvo é VEGFR2, EGFR, CEA, HER2 ou HER3.

[00116] Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional de uma proteína de fusão da revelação tem como alvo o EGFR. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é derivado de

VHH122, descrito em J. Biomol. Tela. 2009 Jan; 14 (l): 77-85. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é derivado de 7Dl2, descrito como Estrutura 21, 1214-1224, 2 de julho de 2013. APO: 4KRM_I e Publicação de Patente US número US2009/0252681.

[00117] Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional de uma proteína de fusão da revelação tem como alvo VEGFR2. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é derivado de 3VGR19, descrito em Mol. Immunol. 2012 Fevereiro; 50 (1-2): 35-41. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é derivado de 4VGR17, descrito em Mol. Immunol. 2012 Fevereiro; 50 (1-2): 35-41. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é derivado de 4VGR38, descrito em Mol. Immunol. 2012 Fevereiro; 50 (1-2): 35-41.

[00118] Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional de uma proteína de fusão da revelação tem como alvo HER2. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é derivado de 2D3, 5F7 ou 47D5, descrito na Patente US Publicação US 2011/0059090.

[00119] Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional de uma proteína de fusão da revelação tem como alvo HER3. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é derivado de BCD090-M2 (PDB ID: 6EZW), descrito na Versão 2. F100Res. 2018; 7:57.

[00120] Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional de uma proteína de fusão da

revelação se liga a CEA. Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é derivado de ABS29544.1 ou NbCEA5, descrito em US20160280795A1, FEBS J. 2009 Jul; 276 (14): 3881-93 e J Nucl Med. 2010 Jul; 51 (7): 1099-106.

[00121] A atividade biológica de um sdAb ou uma variante funcional do mesmo de uma proteína de fusão da revelação pode ser avaliada, por exemplo, determinando sua afinidade de ligação a um alvo ou um epítopo do mesmo. Em algumas formas de realização, a afinidade do sdAb ou sua variante funcional da proteína de fusão para um alvo ou um epítopo do mesmo, pode ser, por exemplo, de cerca de 1 picomolar (pM) a cerca de 100 micromolar (mM) (por exemplo, de aproximadamente 1 picomolar (pM) a cerca de 1 nano molar (nM), de cerca de 1 nM a cerca de 1 micromolar (mM), ou de cerca de 1 pM a cerca de 100 pM). Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional da proteína de fusão pode se ligar a um alvo (por exemplo, VEGFR2, EGFR, HER2, HER3 ou CEA) com um KD menor ou igual a 1 nanomolar (por exemplo, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,05 nM, 0,025 nM, 0,01 nM, 0,001 nM ou um intervalo definido por dois dos valores precedentes). Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional da proteína de fusão da revelação pode se ligar ao alvo com um KD menor ou igual a 200 pM (por exemplo, 190 pM, 175 pM, 150 pM, 125 pM, 110 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 75 pM, 60 pM, 50 pM, 40 pM, 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 1 pM ou um intervalo definido por dois os valores precedentes). A afinidade de um sdAb ou sua variante funcional de uma proteína de fusão aqui revelada para um antígeno ou epítopo de interesse pode ser

medida usando qualquer ensaio reconhecido na técnica. Tais métodos incluem, por exemplo, classificação celular ativada por fluorescência (FACS), esferas separáveis (por exemplo, esferas magnéticas), ressonância plasmônica de superfície (SPR), competição por fase de solução (KINEXA.TM.), Antigen panning, e/ou ELISA (ver, por exemplo, Janeway e outros (Eds.), Immunobiology, 5a ed., Garland Publishing, Nova Iorque, Nova York, 2001).

[00122] Os sdAbs (ou variantes funcionais dos mesmos) e ácidos nucleicos usados para produzir as proteínas de fusão da revelação podem ser preparados como descrito pelos Exemplos abaixo ou por qualquer método conhecido dos versados na técnica.

[00123] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28, 31 e 34; uma CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29, 32 e 35; e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30, 33 e 36.

[00124] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 37 e 40, uma CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 38 e 41 e um CDR3 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 39 e 42.

[00125] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em um CDR1 selecionado do

grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 199, 202 e 205; uma CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 200, 203 e 206; e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 201, 204 e 207.

[00126] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma CDR1 da SEQ ID NO: 208, uma CDR2 da SEQ ID NO: 209 e uma CDR3 da SEQ ID NO: 210.

[00127] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 211 e 214, uma CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 212 e 215 e um CDR3 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 213 e 216.

[00128] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é selecionado a partir do grupo de sdAbs anti-VEGFR2 revelados nos Exemplos, a saber 3VGR19 (SEQ ID NO: 23), 4VGR17 (SEQ ID NO: 24) e 4VGR38 (SEQ ID NO :25). Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é selecionado a partir do grupo de sdAbs anti-EGFR revelado nos Exemplos, a saber VHH122 (SEQ ID NO: 26) e 7D12 (SEQ ID NO: 27). Em algumas formas de realização, o sdAb ou variante funcional do mesmo é selecionado a partir do grupo de sdAbs anti-HER2 revelado nos Exemplos, nomeadamente 2D3 (SEQ ID NO: 69), 5F7 (SEQ ID NO: 70) e 47D5 (SEQ ID NO: 71). Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é selecionado a partir do grupo de sdAbs anti-HER3 revelado nos Exemplos,

a saber BCD090-M2 (SEQ ID NO: 75). Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional é selecionado a partir dos sdAbs anti-CEA revelados nos Exemplos, nomeadamente sdAb anti-CEA (ABS29544.1) (SEQ ID NO: 77) e NbCEA5 (SEQ ID NO: 79).

[00129] Em algumas formas de realização, qualquer um dos sdAbs ou variantes funcionais dos mesmos revelados no presente documento são fundidos com uma proteína CD de levedura ou uma variante funcional do mesmo, compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (CD do tipo selvagem, sem a metionina Terminal N), SEQ ID NO: 22 (uma variante da SEQ ID NO: 21 com mutações pontuais A22L/V107I/I139L), SEQ ID NO: 186 (CD do tipo selvagem, incluindo a metionina Terminal N), SEQ ID NO: 187 (uma variante de SEQ ID NO: 186 com mutações pontuais A23L/V108I/I140L), ou uma variante funcional de qualquer uma das sequências de aminoácidos precedentes.

[00130] Em determinadas formas de realização, as proteínas de fusão compreendem um marcador de histidina (marcador HIS) no terminal C, por exemplo, um marcador 6-HIS (SEQ ID NO: 6). Em algumas formas de realização, a proteína de fusão está ligada ao marcador HIS através de um ligante peptídico (por exemplo, GSS).

[00131] Em algumas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional de uma proteína de fusão da revelação pode ser parcial ou totalmente humanizada para uso em profilaxia e/ou terapia de uma condição que está positivamente associada à presença do alvo do sdAb. Em geral, a humanização envolve a substituição de toda ou parte da estrutura derivada de camelídeos e regiões

variáveis de um sdAb ou uma variante funcional da mesma por uma sequência de contrapartida humana, com o objetivo de reduzir s imunogenicidade do sdAb em aplicações terapêuticas. Em alguns casos, os resíduos FR da imunoglobulina camelídea são substituídos pelos resíduos humanos correspondentes.

[00132] Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende uma ou mais mutações nos seguintes epítopos de células T:

Epítopo	Epítopo restrito a HLA-DR	SEQ ID NO
Epítopo 1	SVQTGGSLRL	63
Epítopo 2	LKPEDTAN	64
Epítopo 3	IYYCAAAAGS	65

[00133] Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende uma sequência $X_1X_2QX_3X_4GX_5LRL$ modificada a partir do epítopo 1 (SEQ ID NO: 63), em que X_1 pode ser substituído por V, X_2 pode ser substituído por A, X_3 pode ser substituído por V, X_4 pode ser substituído por D e/ou X_5 pode ser substituído por D ou E. Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende uma sequência $LX_1X_2EDX_3X_4X_5Y$ modificada a partir do epítopo 2 (SEQ ID NO: 64), em que X_1 pode ser substituído por R, A, D, S ou T; X_2 pode ser substituído por A, D ou E; X_3 pode ser substituído por D, E, G, H ou Q; X_4 pode ser substituído por D ou E; e/ou X_5 podem ser substituídos por V, A, T, R, Q ou N. Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende uma sequência X_1YYCAAAAGS modificada a

partir do epítopo 3 (SEQ ID NO: 65), em que X_1 pode ser substituído por V, A, T, R, Q ou N.

[00134] Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende uma sequência $X_1X_2QX_3X_4GSLRL$ modificada a partir do epítopo 1 (SEQ ID NO: 63), em que X_1 pode ser substituído por V, X_2 pode ser substituído por A, X_3 pode ser substituído por V e/ou X_4 pode ser substituído por D. Em determinadas formas de realização, o sdAb ou variante funcional do mesmo compreende uma sequência $LX_1X_2EDTAX_5Y$ modificada a partir do epítopo 2 (SEQ ID NO: 64), em que X_1 pode ser substituído por R ou T; X_2 pode ser substituído por A; e/ou X_5 podem ser substituídos por V ou R. Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende uma sequência $X_1YYCAAAAGS$ modificada a partir do epítopo 3 (SEQ ID NO: 65), em que X_1 pode ser substituído por V ou R.

[00135] Em determinadas formas de realização, o sdAb ou sua variante funcional compreende uma sequência FR1 com uma sequência $ESGGGX_1X_2QX_3GGSL$, em que X_1 é S ou V, X_2 é V ou A, e X_3 é A, T ou V. Em determinadas formas de realização, o sdAb ou variante funcional deste compreende uma sequência FR3 compreendendo uma sequência modificada $MNSLX_1X_2EDTAX_3YYCAA$, em que X_1 é K, R ou T; X_2 é P ou A; e X_3 é R ou V.

[00136] As sequências de aminoácidos de anticorpo de domínio único estão intimamente relacionadas com as sequências de aminoácidos VH da família humana III. Por conseguinte, em algumas formas de realização, formas de sdAb "humanizadas" são produzidas. Em algumas formas de realização, os sdAbs ou sua variante funcional são

derivados do HCAb produzido pela imunização de um camundongo transgênico com um peptídeo alvo no qual a expressão do anticorpo endógeno de murino foi eliminada e os transgenes humanos foram introduzidos. Os camundongos HCAb são revelados na Patente US 8.883.150, Patente US 8.921.524, Patente US 8.921.522, Patente US 8.507.748, Patente US número 8.502.014, US 2014/0356908, US2014/0033335, US2014/0037616, US2014/0356908, US2013/0344057, US2013/0323235, US2011/0118444 e US2009/0307787, todos os quais são incorporados ao presente documento como referência para tudo o que divulgam em relação a anticorpos apenas de cadeia pesada e sua produção em camundongos transgênicos. Os camundongos HCAb são imunizados e as células do baço iniciadas resultantes são fundidas com células de mieloma murino para formar hibridomas. O HCAb resultante pode então ser totalmente humano, substituindo as regiões murinas CH2 e CH3 pelas sequências humanas correspondentes.

[00137] Métodos adicionais para a produção de sdAbs ou variantes funcionais dos mesmos para as proteínas de fusão da revelação são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um método para obter sdAbs ou variantes funcionais dos mesmos inclui (a) imunização de um Camelídeo com um ou mais antígenos, (b) isolamento dos linfócitos periféricos do Camelídeo imunizado, obtendo o RNA total e sintetização dos DNAcs correspondentes, (c) construção de uma biblioteca de fragmentos de DNAc que codificam domínios sdAb, (d) transcrição dos DNAcs que codificam domínio sdAb obtidos na etapa (c) para RNAm usando PCR, convertendo o RNAm em formato de exibição de ribossomo ou fago e selecionando o

domínio sdAb por exibição de ribossomo ou fago exibição do panorama e (e) expressão do domínio sdAb em um vetor adequado e, opcionalmente, purificação do domínio sdAb expresso. Outros métodos exemplares são descritos em qualquer uma das referências fornecidas em Revets e outros, 2015 Expert Opin. Biol. Ther. (2005) 5(1): 111-124, “Generation and production of recombinant nanobodies". Além disso, a Harbor Biomed fornece uma plataforma de tecnologia de roedores de cadeia pesada humana e construções de cadeia pesada humana, descritas nas Patentes US números 9.353.179, 9.346.877 e 8.921.522, e nas Patentes Europeias 1776383 e 1864998, todas incorporadas ao presente documento como referência. Ablynx também fornece uma fonte de nanocorpos que podem ser usados para produzir os compostos da revelação.

[00138] Para uma descrição adicional dos nanocorpos, é feita referência às seguintes referências, cada uma delas incorporada no presente documento por referência: artigo de revisão de Muyldermans (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001), bem como aos seguintes pedidos de patente, mencionados como antecedentes gerais: WO 94/04678, WO 95/04079 e WO 96/34103 da Vrije Universiteit Brussel; WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 e WO 02/48193 da Unilever; WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 e WO 03/055527 do Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); WO 03/050531 de Algonomics N.V. e Ablynx N.V.; WO 01/90190 pelo National Research Council of Canada; WO 03/025020 (correspondente a EP 1433793) pelo Institute of Antibodies;

bem como WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 e WO 06/122825, da Ablynx N.V. e os outros pedidos de patente publicados pela Ablynx N.V. Também é feita referência à técnica adicional mencionada nesses aplicativos e, em particular, à lista de referências mencionadas nas páginas 41-43 da Pedido internacional WO 06/040153, cuja lista e referências são aqui incorporadas por referência. Como descrito nestas referências, os nanocorpos (em particular, sequências VHH e nanocorpos parcialmente humanizados) podem ser caracterizados em particular pela presença de um ou mais "resíduos Hallmark" em uma ou mais das sequências estruturais. Uma descrição adicional dos nanocorpos, incluindo humanização e/ou camelização de nanocorpos, bem como outras modificações, partes ou fragmentos, derivados ou "fusões de nanocorpos", construções multivalentes (incluindo alguns exemplos não limitativos de sequências de ligação) e diferentes modificações para aumentar a meia-vida dos nanocorpos e suas preparações pode ser encontrada, por exemplo, em WO 08/101985 e WO 08/142164. Para uma descrição geral adicional dos nanocorpos, é feita referência ao WO 08/020079 (página 16, página 61, linha 24 à página 98, linha 3).

LIGAÇÕES EXEMPLARES DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO DA REVELAÇÃO

[00139] Os termos "ligante", "ligante peptídico", "domínio ligante" e "região ligante" (abreviado "L"), conforme aqui utilizados, são usados de forma intercambiável e se referem a uma região oligo ou

polipeptídica de cerca de 1 a 100 aminoácidos de comprimento, que liga polipeptídeos das proteínas de fusão da revelação (por exemplo, o sdAb ou sua variante funcional e a proteína CD ou sua variante funcional). Uma proteína de fusão da revelação pode compreender um ou mais de um ligante. Os ligantes podem ser compostos de resíduos flexíveis como glicina e serina, de modo que os domínios proteicos adjacentes estejam livres para se moverem um em relação ao outro. Em algumas formas de realização, o ligante compreende 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10 ou 1 a 9 aminoácidos. Em algumas formas de realização, o ligante compreende de um a nove aminoácidos, por exemplo, um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito ou nove aminoácidos. Em algumas formas de realização, o ligante é um peptídeo que varia de cerca de 6 a cerca de 30 aminoácidos de comprimento. Em aspectos dessas formas de realização, o ligante peptídico pode ser, por exemplo, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, pelo menos 24, pelo menos 25, pelo menos 26, pelo menos 27, pelo menos 27 28, com pelo menos 29 ou 30 aminoácidos de comprimento. Em outros aspectos dessas formas de realização, o ligante peptídico pode ser, por exemplo, no máximo 6, no máximo 7, no máximo 8, no máximo 9, no máximo 10, no máximo 11, no máximo 12, no máximo 13, no máximo 14, no máximo 15, no máximo 16, no máximo 16, no máximo 17, no máximo 18, no máximo 19, no máximo 20, no máximo 21, no máximo 22, no máximo 23, no

máximo 24, no máximo 25, no máximo 26, no máximo 27, no máximo 28, no máximo 29 ou no máximo 30 aminoácidos de comprimento. Em outros aspectos dessas formas de realização, o ligante peptídico pode ser, por exemplo, cerca de 6 a cerca de 8, cerca de 6 a cerca de 10, cerca de 6 a cerca de 12, cerca de 6 a cerca de 14, cerca de 6 a cerca de 14, cerca de 6 a cerca de 16, cerca de 6 a cerca de 18 , cerca de 6 a cerca de 20, cerca de 6 a cerca de 22, cerca de 6 a cerca de 24, cerca de 6 a cerca de 26, cerca de 6 a cerca de 28, cerca de 6 a cerca de 30, cerca de 8 a cerca de 10, cerca de 8 a cerca de 12, cerca de 8 a cerca de 14, cerca de 8 a cerca de 16, cerca de 8 a cerca de 18, cerca de 8 a cerca de 20, cerca de 8 a cerca de 22, cerca de 8 a cerca de 24, cerca de 8 a cerca de 26, cerca de 8 a cerca de 26, cerca de 8 a cerca de 28, cerca de 8 a cerca de 30, cerca de 10 a cerca de 12, cerca de 10 a cerca de 14, cerca de 10 a cerca de 16, cerca de 10 a cerca de 18, cerca de 10 a cerca de 20, cerca de 10 a cerca de 22, cerca de 10 a cerca de 24, cerca de 10 a cerca de 26 , cerca de 10 a cerca de 28, cerca de 10 a cerca de 30, cerca de 12 a cerca de 14, cerca de 12 a cerca de 16, cerca de 12 a cerca de 18, cerca de 12 a cerca de 20, cerca de 12 a cerca de 22, cerca de 12 a cerca de 24, cerca de 12 a cerca de 26, cerca de 12 a cerca de 28, cerca de 12 a cerca de 30, cerca de 14 a cerca de 16, cerca de 14 a cerca de 18, cerca de 14 a cerca de 20, cerca de 14 a cerca de 22, cerca de 14 a cerca de 24, cerca de 14 a cerca de 26, cerca de 14 a cerca de 28, cerca de 14 a cerca de 30, cerca de 14 a cerca de 30, cerca de 16 a cerca de 18, cerca de 16 a cerca de 20, cerca de 16 a cerca de 22, cerca de 16 a cerca de 24, cerca

de 16 a cerca de 26, cerca de 16 a cerca de 28, cerca de 16 a cerca de 30, cerca de 18 a cerca de 20, cerca de 18 a cerca de 22, cerca de 18 a cerca de 24, cerca de 18 a cerca de 26, cerca de 18 a cerca de 28, cerca de 18 a cerca de 30, cerca de 20 a cerca de 22, cerca de 20 a cerca de 24, cerca de 20 a cerca de 26, cerca de 20 a cerca de 28, cerca de 20 a cerca de 30, cerca de 22 a cerca de 24, cerca de 22 a cerca de 26, cerca de 22 a cerca de 28, cerca de 22 a cerca de 30, cerca de 24 a cerca de 26, cerca de 24 a cerca de 28, cerca de 24 a cerca de 30, cerca de 26 a cerca de 28, cerca de 26 a cerca de 30 ou cerca de 26 a cerca de 30 aminoácidos de comprimento. Em algumas formas de realização, a região ligante compreende 1-50 aminoácidos.

[00140] O ligante pode compreender aminoácidos naturais ou não naturais. Em algumas formas de realização, o ligante compreende qualquer aminoácido, combinações de diferentes aminoácidos ou o mesmo aminoácido. Os ligantes podem ser sequências peptídicas de diferentes tipos, ligadas uma ou mais vezes seguidas ou alternadas com outras sequências. Os ligantes também podem ser sequências peptídicas que são repetidas. Em algumas formas de realização, uma sequência peptídica inteira é repetida 1 a 50 vezes. Os vinculadores mais longos também podem ser usados quando é desejável garantir que dois domínios adjacentes não interfiram estereotipicamente.

[00141] Em algumas formas de realização, o ligante é (GGGGS)n, onde n = 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 (SEQ ID NO: 1). Em algumas formas de realização, o ligante é um ou mais de GSGG (SEQ ID NO: 2), GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 3) e/ou um ou mais GSG. Em algumas formas de realização, o ligante é

KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 4) ou EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 5). Em algumas formas de realização, o ligante é (GGGGS) 3 (SEQ ID NO: 188). Resíduos de aminoácidos exemplificativos para uso em ligantes incluem glicina, treonina, arginina, serina, alanina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, prolina, ácido glutâmico e/ou lisina. Exemplos de outros ligantes que podem ser utilizados para proteínas de fusão são bem conhecidos na técnica e alguns podem ser encontrados em Chen, X. e outros, Adv Drug Deliv. Rev. 2013 15 de outubro; 65 (10): 1357-1369, incorporado ao presente documento como referência na sua totalidade. Ligantes adicionais adequados para proteínas de fusão da presente revelação também podem ser encontrados em Klein e outros, Protein Eng. Des. Sel. 2014 Out; 27 (10): 325-330, incorporado ao presente documento como referência na sua totalidade.

[00142] Em algumas formas de realização, uma proteína de fusão da revelação compreende um ligante entre um sdAb ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional do mesmo. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende pelo menos um ligante entre um sdAb ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional do mesmo. Por exemplo, em alguns aspectos, a proteína de fusão compreende dois ligantes entre um sdAb ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional do mesmo.

[00143] Em algumas formas de realização, um sdAb ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional do mesmo são fundidos diretamente (por exemplo, não tendo ligante de conexão).

PROTEÍNAS EXEMPLARES DE CITOSSINA DEAMINASE (CD) DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO DA REVELAÇÃO

[00144] A citosina desaminase (CD) é uma enzima capaz de converter o pró-fármaco 5-fluorcitosina (5-FC) relativamente inofensivo em 5-fluoruracila (5-FU), que é um composto citotóxico, em particular quando é convertido em 5-5'-monofosfato de fluoruridina (5-FdUMP). Por conseguinte, as proteínas de fusão da revelação se ligam às células que expressam o alvo dos sdAbs ou variantes funcionais da revelação, e a proteína CD ou sua variante funcional da proteína de fusão converterá 5-FC em 5-FU, matando assim as células alvo. Em algumas formas de realização, as células alvo são células cancerígenas. Em algumas formas de realização, as células alvo são mortas através de um efeito de espectador. Anticancer Res. 1998 Set-out; 18 (5A): 3399-406; Am J Cancer Res. 2015; 5(9): 2686-2696.

[00145] Em algumas formas de realização, a CD ou sua variante funcional pode ser CD de levedura ou uma sua variante funcional. Em algumas formas de realização, a CD ou sua variante funcional pode ser um CD bacteriano ou uma sua variante funcional. Em algumas formas de realização, o CD ou sua variante funcional é a *E. coli* citosina desaminase ou uma sua variante funcional. Por exemplo, em algumas formas de realização, a CD ou sua variante funcional é uma citosina-desaminase de *E. coli* representada pela NCBI Reference Sequence: NP_414871.1. Em algumas formas de realização, a CD ou sua variante funcional é uma citosina desaminase de levedura representada pelo número de acesso do GenBank AAB67713.1. O gene FCY1 de *Saccharomyces*

cerevisiae (S. cerevisiae) e o gene coda de *E. coli*, que codificam, respectivamente, a CD desses dois organismos, são conhecidos e suas sequências são publicadas (EP 402108; Erbs e outros, 1997, Curr. Genet. 31, 1-6; WO 93/01281).

[00146] Em determinadas formas de realização, a proteína CD ou sua variante funcional compreende a sequência da SEQ ID NO: 21. Em determinadas formas de realização, a proteína CD ou sua variante funcional compreende a sequência da SEQ ID NO: 186. Em determinadas formas de realização, a sequência correspondente à citosina desaminase contém uma ou mais alterações. Em algumas formas de realização, as alterações resultam em uma variante funcional de um CD do tipo selvagem. De preferência, as alterações no domínio CD são mutações estabilizadoras. Por exemplo, em algumas formas de realização, a variante funcional de CD compreende a sequência da SEQ ID NO: 22, tendo A22L/V 107I/1139L em comparação com a SEQ ID NO: 21. Em algumas formas de realização, a variante funcional de CD compreende a sequência da SEQ ID NO: 187, com A23L/V 108 I/I 140 L em comparação com a SEQ ID NO: 186.

[00147] A revelação também fornece proteínas de fusão compreendendo um polipeptídeo de CD que compreende uma sequência que é pelo menos 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 21, 22, 186 ou 187, em que o polipeptídeo possui atividade de citosina desaminase e, portanto, é chamada de “variante funcional”.

[00148] Em algumas formas de realização, a variante funcional da proteína CD pode ser uma forma desimunizada para reduzir a imunogenicidade. Em determinadas formas de realização, a proteína CD ou sua

variante funcional compreende uma ou mais mutações nos seguintes epítopos de células T:

Epítopo	Epítopo restrito HLA-DR	SEQ ID NO
Epítopo 4	YTTLSPCDM	66
Epítopo 5	MCTGAIIMY	67
Epítopo 6	VVVVDDERCKK	68

[00149] Em determinadas formas de realização, a proteína CD ou sua variante funcional compreende uma sequência $X_1X_2X_3$LSPCD X_4 modificada a partir do epítopo 4 (SEQ ID NO: 66), em que X_1 pode ser substituído por A ou H, X_2 pode ser substituído por D ou X_3 pode ser substituído por D, X_3 pode ser substituído por E, e X_4 pode ser substituído por N, A, K ou Q. Em determinadas formas de realização, a proteína CD ou sua variante funcional compreende uma sequência XiCTGAIIMY modificada a partir do epítopo 5 (SEQ ID NO: 67), em que X_1 pode ser substituído por N, A, K ou Q. Em determinadas formas de realização, a proteína CD ou sua variante funcional compreende uma sequência $X_1X_2X_3$VDDERCKK modificada a partir do epítopo 6 (SEQ ID NO: 68), em que X_1 pode ser substituído por A ou T, X_2 pode ser substituído por A, L, I ou T e X_3 pode ser substituído por A ou T.

[00150] Em determinadas formas de realização, a proteína CD ou sua variante funcional compreende uma sequência X_1X_2VVDDERCKK modificada a partir do epítopo 6 (SEQ ID NO: 68), em que X_1 pode ser substituído por A, X_2 pode ser substituído por T.

[00151] Em algumas formas de realização, as variantes funcionais de CD são variantes das SEQ ID NOs: 21

ou 22, em que as variantes compreendem pelo menos uma mutação selecionada de Y84A, Y84H, T85D, T86E, M92N, M92A, M92K, M92Q, V128A, V128T, V129A, V129L, V129I, V129T, V130A e V130T. Em algumas formas de realização, as variantes funcionais de CD são variantes das SEQ ID NOs: 186 ou 187, em que as variantes compreendem pelo menos uma mutação selecionada de Y85A, Y85H, T86D, T87E, M93N, M93A, M93K, M93Q, VI 29 A, V129T, V130A, V130L, V130I, V130T, V131A e V131T.

[00152] Em determinadas formas de realização, a variante funcional da proteína CD é selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 22, 187, 189, 190, 191, 192, 193 e 194. Em determinadas formas de realização, a variante funcional da proteína CD é selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 22, 189, 191 e 193.

[00153] Os ensaios para medir a atividade da citosina desaminase são conhecidos na técnica. Por exemplo, a atividade da citosina desaminase pode ser medida determinando a taxa de conversão de 5-FC em 5-FU ou citosina em uracila. A detecção de 5-FC, 5-FU, citosina e uracila pode ser realizada pelos métodos descritos na seção Exemplos, por cromatografia e/ou por outros métodos conhecidos na técnica.

PROTEÍNAS DE FUSÃO EXEMPLARES DA REVELAÇÃO

[00154] A revelação fornece exemplos de várias proteínas de fusão, como descrito abaixo:

[00155] A revelação fornece proteínas de fusão compreendendo a fórmula (I) ou a fórmula (II):

N-(L) n-C (fórmula I);

C-(L) n-N (fórmula II);

em que N é um anticorpo de domínio único (sdAb) ou uma variante funcional do mesmo, L é um ligante peptídico e n = 0-50 e C é uma proteína da citosina desaminase (CD) ou uma variante funcional da mesma. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente na fórmula I. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste na fórmula I. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente na fórmula II. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste na fórmula II.

[00156] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende a fórmula I, de modo que o terminal C do ligante peptídico ou o terminal C do sdAb ou sua variante funcional seja fundido ao terminal N da proteína CD ou sua variante funcional. Por exemplo, em alguns aspectos, o ligante peptídico não está presente e o terminal C do sdAb ou sua variante funcional é fundido ao terminal N da proteína CD ou sua variante funcional. Em alguns aspectos, o ligante peptídico está presente e o terminal C do sdAb ou sua variante funcional é fundido ao terminal N do ligante peptídico, e o terminal C do ligante peptídico é fundido ao terminal N de a proteína CD ou sua variante funcional.

[00157] Em outras formas de realização, a proteína de fusão compreende a fórmula II, de modo que o terminal C do ligante peptídico ou o terminal C da proteína CD ou sua variante funcional seja fundido ao terminal N do sdAb ou sua variante funcional. Por exemplo, em alguns aspectos, o ligante peptídico não está presente e o terminal C da proteína CD ou sua variante funcional é

fundido ao terminal N do sdAb ou sua variante funcional. Em alguns aspectos, o ligante peptídico está presente e o terminal C da proteína CD ou sua variante funcional é fundido ao terminal N do ligante peptídico, e o terminal C do ligante peptídico é fundido ao terminal N do sdAb ou sua variante funcional.

[00158] A revelação também fornece proteínas de fusão compreendendo sdAbs - direcionadas contra antígenos alvo extracelulares, incluindo, mas não se limitando a, qualquer um dos antígenos alvo descritos no presente documento - fundidas a qualquer uma das citosina-desaminases descritas no presente documento.

[00159] Por exemplo, em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 7, 9, 11, 13, 15, 17 ou aminoácidos 1-297 de qualquer uma das sequências precedentes. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente na sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 7, 9, 11, 13, 15, 17 ou aminoácidos 1-297 de qualquer uma das sequências precedentes. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste na sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 7, 9, 11, 13, 15, 17 ou aminoácidos 1-297 de qualquer uma das sequências precedentes.

[00160] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 17, 19 e 93-185. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID

NOs: 17, 19 e 93-185. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 17, 19 e 93-185.

[00161] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende os aminoácidos 1-297 de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 93-181. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente nos aminoácidos 1-297 de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 93-181. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste nos aminoácidos 1-297 de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 93-181.

[00162] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 19, 182, 183, 184 e 185. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na SEQ ID NO: 19, 182, 183, 184 e 185. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na SEQ ID NO: 19, 182, 183, 184 e 185.

[00163] A revelação também fornece proteínas de fusão compreendendo mais de um sdAb ou sua variante funcional ou proteína CD ou variante funcional do mesmo. Por exemplo, a proteína de fusão pode ter a seguinte fórmula III ou IV:

$N1 - [(L1)_n-N2]_{n1} - (L2)_n- (C)-[(L3)n-C]_{n2}$ (fórmula III);

$(C)-[(L1)_n-C]_{n2}-(L2)_n$ $N1 - [(L3)_n-N2]_{n1}$ (fórmula IV);

em que: NI e N2 são cada um sdAb ou uma variante funcional do mesmo, em que N1 e N2 podem ser os mesmos sdAb ou diferentes ou variante funcional do mesmo e em que n1 = 0-10; L1, L2 e L3 são cada um ligante peptídico, em que n = 0-50; C é uma proteína citosina desaminase (CD) ou uma sua variante funcional, em que n2 = 0-10.

[00164] Por exemplo, a proteína de fusão pode ter a seguinte fórmula:

N1-L1-N2-L2-C;

N1-L-N2-L2-C-L3-C;

N1-N2-L-C;

N1-N2-L-C; ou

N1-L-C-N2-L2-C;

em que N1 e N2 podem ser iguais ou diferentes e em que qualquer um de L1, L2 e L3 pode ser igual ou diferente.

[00165] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão é uma proteína de fusão bivalente compreendendo dois sdAbs diferentes ou variantes funcionais dos mesmos (isto é, liga dois alvos diferentes ou dois epítopos diferentes no mesmo alvo). Em algumas formas de realização, a proteína de fusão é uma proteína de fusão monovalente.

[00166] As proteínas de fusão da revelação podem ser ainda fundidas com porções, por exemplo, marcadores peptídicos, para facilitar a purificação, vide por exemplo,

WO 93/21232; EP 439 095; Naramura e outros, Immunol Lett 39:91 (1994); Patente número 5.474.981; Gillies e outros, Proc Natl Acad Sei USA 89: 1428 (1992); e Fell e outros, J. Immunol 146: 2446 (1991). Em algumas formas de realização, o marcador peptídico é um marcador histidina (HIS). Por exemplo, em algumas formas de realização, o marcador peptídico é um peptídeo hexa-histidina (SEQ ID NO: 6). O marcador hexa-histidina pode ser o marcador fornecido em um vetor pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, Califórnia) ou em outro vetor, muitos dos quais estão disponíveis comercialmente, Gentz e outros, Proc Natl Acad Sci USA 86: 821 (1989). Outras marcadores peptídicos úteis para purificação incluem, entre outros, marcador "HA", que corresponde a um epítopo derivado da proteína hemaglutinina da influenza (Wilson e outros, Cell 37: 767 (1984)) e o "FLAG™". O marcador peptídico pode estar localizado no terminal N da proteína de fusão, no terminal C da proteína de fusão ou entre domínios funcionais (por exemplo, entre sdAb e CD ou variante funcional (s)) da proteína de fusão. O marcador peptídico pode ser conectado à proteína de fusão por um ligante peptídico. Por exemplo, o ligante peptídico que conecta a proteína de fusão e o marcador (por exemplo, marcador HIS) pode ser GSS.

[00167] A revelação abrange ainda proteínas de fusão que são conjugadas com porções químicas, incluindo, por exemplo, porções citotóxicas/quimioterapêuticas e/ou radiomarcadores. Qualquer um dos agentes citotóxicos e agentes quimioterapêuticos descritos no presente documento para tratamento combinado com as proteínas de fusão da revelação pode ser quimicamente conjugado com as proteínas

de fusão da revelação. Em algumas formas de realização, o agente citotóxico ou agente quimioterapêutico é conjugado covalentemente à proteína de fusão. Em algumas formas de realização, o agente citotóxico do agente quimioterapêutico é conjugado de forma não covalente à proteína de fusão.

[00168] Em algumas formas de realização, a conjugação das proteínas de fusão da revelação ao agente citotóxico ou quimioterápico é através de um ligante selecionado do grupo que consiste em um grupo dissulfeto, um grupo tioéter, um grupo lábil a ácidos, um grupo fotolábil, um grupo peptidase lábil e um grupo esterase lábil.

[00169] Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão da revelação são conjugadas com agentes citotóxicos e/ou citostáticos. Em alguns aspectos dessas formas de realização, o agente citotóxico e/ou citostático é conjugado com um sdAb ou uma variante funcional do mesmo da proteína de fusão. Em alguns aspectos dessas formas de realização, o agente citotóxico e/ou citostático é conjugado a uma proteína CD ou sua variante funcional da proteína de fusão.

[00170] Em outras formas de realização, a proteína de fusão é conjugada (química ou geneticamente) ou acoplada a uma citocina, um superantígeno e/ou uma toxina.

[00171] Em algumas formas de realização, a farmacocinética da proteína de fusão, incluindo a meia-vida da proteína de fusão, pode ser melhorada por modificação química, como a adição de poli (alquileno) glicol como poli (etileno) glicol ("PEGuilação"), POLY PEG, PASilação ou por incorporação em um lipossomo. Em algumas formas de

realização, a proteína de fusão (por exemplo, o sdAb ou sua variante funcional) compreende um ou mais resíduos de aminoácidos adicionais que permitem a pegilação e/ou facilitam a pegilação (por exemplo, um resíduo de cisteína adicional para facilitar a conexão de um grupo PEG). Em algumas formas de realização, a meia-vida da proteína de fusão é aumentada pela ligação de ácido polissiálico (PSA), hidroxietilamido (HES), ligantes de ligação à albumina ou um escudo de carboidrato à proteína de fusão; por fusão genética a uma proteína que liga proteínas séricas, como albumina, IgG, FcRn e/ou transferrina; por fusão genética com albumina ou um domínio da albumina ou com uma proteína de ligação à albumina; ou pela incorporação da proteína de fusão em um nanoveículo, formulação de liberação lenta ou dispositivo médico.

[00172] Em algumas formas de realização, a proteína de fusão pode ser modificada por glicosilação, acetilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de proteção/bloqueio conhecidos e/ou clivagem proteolítica. Essas modificações podem ser realizadas por técnicas conhecidas, incluindo, mas não se limitando a, clivagem química específica, acetilação, formilação e outras conhecidas na técnica. Além disso, a proteína de fusão pode compreender um ou mais aminoácidos não clássicos.

[00173] Em algumas formas de realização, como para fins de diagnóstico ou ensaio (por exemplo, geração de imagens para permitir, por exemplo, monitorar terapias ou rastrear a distribuição da proteína de fusão), a proteína de fusão pode compreender um marcador detectável.

Marcadores e métodos detectáveis adequados para marcar uma proteína são bem conhecidos na técnica. Marcadores detectáveis adequados incluem, por exemplo, um radioisótopo (por exemplo, Índio-111, Tecnécio-99m ou Iodo-l3l), marcadores emissoras de pósitrons (por exemplo, Flúor-l9), íons paramagnéticos (por exemplo, Gadolínio (III), Manganês (II)), um rótulo de epítopo (marcador), um rótulo de afinidade (por exemplo, biotina, avidina), um rótulo de rotação, uma enzima, um grupo fluorescente ou um grupo quimioluminescente. Quando não são utilizados marcadores, a formação de complexos (por exemplo, entre a proteína de fusão e um alvo) pode ser determinada por ressonância plasmônica de superfície, ELISA, FACS ou outros métodos adequados conhecidos na técnica.

ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS DA REVELAÇÃO

[00174] Ácidos nucleicos, incluindo sequências nucleotídicas que codificam os sdAbs, ligantes, proteínas CD, variantes funcionais de sdAb e/ou proteínas CD, proteínas de fusão ou equivalentes funcionais de qualquer um dos precedentes, como descrito no presente documento, são usados em moléculas de DNA recombinante que direcionam a expressão das proteínas de fusão da revelação em células hospedeiras apropriadas, como células bacterianas. Como usado no presente documento, o termo "molécula de ácido nucleico" ou "polinucleotídeo" pretende incluir moléculas de DNA (por exemplo, DNAc ou DNA genômico) e moléculas de RNA (por exemplo, RNAm) e análogos do DNA ou RNA gerados usando análogos de nucleotídeo. A molécula de ácido nucleico pode ser de fita simples ou dupla.

[00175] Em alguns aspectos, a presente revelação se refere a polinucleotídeos que codificam uma citosina desaminase ou um polipeptídeo mutante de citosina desaminase ou porções biologicamente ativas dos mesmos; polinucleotídeos que codificam um sdAb ou suas variantes biologicamente ativas; polinucleotídeos que codificam um ou mais ligantes da revelação; e polinucleotídeos que codificam uma proteína de fusão da revelação.

[00176] Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo que codifica um CD ou uma variante funcional do mesmo é um polinucleotídeo otimizado por códon. Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo de CD ou polinucleotídeo otimizado por códon compreende formas recombinantes, manipuladas ou isoladas de ácidos nucleicos de ocorrência natural isolados de um organismo, por exemplo, uma cepa bacteriana ou de levedura. Polinucleotídeos de CD exemplificativos incluem aqueles que codificam um polipeptídeo apresentado nas SEQ ID NOs: 21, 22, 186 ou 187. Os ácidos nucleicos usados nos exemplos desta revelação estão dentro do escopo das formas de realização.

[00177] Em algumas formas de realização, os polinucleotídeos de CD ou sdAb (incluindo polinucleotídeos otimizados por códon) são produzidos diversificando, por exemplo, recombinando e/ou mutando uma ou mais sequências de polinucleotídeos de CD ou sdAb de ocorrência natural, isoladas ou recombinantes. Como descrito em mais detalhes em outra parte deste documento, é possível gerar diversos polinucleotídeos de CD ou sdAb que codificam polipeptídeos de CD ou sdAb (por exemplo, uma variante funcional de CD ou

sdAb) com atributos funcionais superiores, por exemplo, função catalítica aumentada, estabilidade aumentada ou maior nível de expressão do que um polinucleotídeo CD ou sdAb não modificado usado como substrato ou progenitor no processo de diversificação. Devido à degeneração do código genético, várias sequências de ácidos nucleicos que codificam substancialmente a mesma ou uma sequência de aminoácidos funcionalmente equivalente podem ser usadas para clonar e/ou expressar as proteínas de fusão da revelação.

[00178] Os polinucleotídeos da revelação têm uma variedade de usos, por exemplo, na produção recombinante (ou seja, expressão) das proteínas de fusão da revelação e como substratos para geração de diversidade adicional, por exemplo, reações de recombinação ou reações de mutação para produzir novas e/ou variantes melhoradas e similares.

[00179] Certas utilidades específicas, substanciais e credíveis dos polinucleotídeos de CD e anticorpo de domínio único da revelação não exigem que o polinucleotídeo codifique um polipeptídeo com atividade CD substancial, ou mesmo atividade CD variante, ou atividade sdAb (por exemplo, ligação ao alvo). Por exemplo, polinucleotídeos de CD que não codificam enzimas ativas podem ser fontes valiosas de polinucleotídeos parentais para uso em procedimentos de diversificação para chegar às variantes de polinucleotídeos de CD ou polinucleotídeos não CD, com propriedades funcionais desejáveis (por exemplo, kcat alto ou kcat/Km, Km baixo, alta estabilidade ao calor ou outros fatores ambientais, altas taxas de transcrição ou tradução, resistência à clivagem proteolítica, maior

ligação ao antígeno, maior especificidade ao antígeno, menor imunogenicidade).

[00180] Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo que codifica um sdAb ou uma variante funcional do mesmo é um polinucleotídeo otimizado por códon. Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo sdAb ou polinucleotídeo otimizado por códon sdAb compreende formas recombinantes, manipuladas ou isoladas de ácidos nucleicos de ocorrência natural isolados de um organismo, por exemplo, dromedários, camelos, lhamas, alpacas ou tubarões.

[00181] Polinucleotídeos exemplificativos que codificam uma proteína de fusão da revelação incluem aqueles estabelecidos nas SEQ ID NOs: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 195-198.

[00182] O termo "célula hospedeira", conforme usado no presente documento, inclui qualquer célula que é suscetível à transformação com uma construção de ácido nucleico.

O termo "transformação" significa a introdução de um gene estranho (isto é, extrínseco ou extracelular), sequência de DNA ou RNA em uma célula hospedeira, de modo que a célula hospedeira expresse o gene ou sequência introduzida para produzir uma substância desejada, tipicamente uma proteína ou enzima codificada pelo gene ou sequência introduzida. O gene ou sequência introduzida pode incluir sequências reguladoras ou de controle, como de início, paradar, promotor, sinal, secreção ou outras sequências usadas pela maquinaria genética da célula. Uma célula hospedeira que recebe e expressa DNA ou RNA

introduzido foi "transformada" e é uma "transformante" ou "clone". O DNA ou RNA introduzido em uma célula hospedeira pode vir de qualquer fonte, incluindo células do mesmo gênero ou espécie que a célula hospedeira, ou células de um gênero ou espécie diferente, ou por síntese genética.

[00183] O termo "sequências otimizadas por códons" geralmente se refere a sequências nucleotídicas que foram otimizadas para uma espécie hospedeira específica, substituindo quaisquer códons com uma frequência de uso inferior a cerca de 20%. Sequências nucleotídicas que foram otimizadas para expressão em uma dada espécie hospedeira, por exemplo, por eliminação de sequências de poliadenilação espúrias, eliminação de sinais de emenda de éxon/íntron, eliminação de repetições do tipo transposon e/ou otimização do conteúdo de GC, além de otimização de códon são referidas no presente documento como "sequências aprimoradas de expressão."

[00184] A revelação fornece ainda um vetor compreendendo uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam as proteínas CD reveladas ou suas variantes funcionais, sdAbs ou variantes funcionais, ligantes e/ou proteínas de fusão. O vetor pode ser, por exemplo, um plasmídeo, episssoma, cosmídeo, vetor viral (por exemplo, retroviral ou adenoviral) ou fago. Os vetores e métodos adequados de preparação de vetores são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Sambrook e outros, Molecular Cloning, Manual de Laboratório, 4ª edição, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) e Ausubel e outros, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates e John

Wiley & Sons, Nova York, NY (1994, e capítulos atualizados disponíveis on-line)).

[00185] Em algumas formas de realização, um vetor compreendendo um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais sequências de aminoácidos reveladas no presente documento podem introduzidas em uma célula hospedeira que é capaz de expressar os polipeptídeos/proteínas codificadas por ele, incluindo qualquer célula procariótica ou eucariótica adequada. Como tal, a revelação fornece uma célula (incluindo uma célula isolada) compreendendo um vetor revelado. As células hospedeiras preferidas são aquelas que podem ser cultivadas com facilidade e confiabilidade, têm taxas de crescimento razoavelmente rápidas, têm sistemas de expressão bem caracterizados e podem ser transformadas ou transfectadas com facilidade e eficiência.

[00186] Exemplos de células hospedeiras procarióticas adequadas incluem, mas não estão limitadas às células dos gêneros *Bacillus* (como *Bacillus subtilis* e *Bacillus brevis*), *Escherichia* (como *E. coli*), *Pseudomonas, Streptomyces, Salmonella e Erwinia*. Células hospedeiras procarióticas adequadas adicionais incluem as várias cepas de *Escherichia coli* (por exemplo, K12, HB101 (ATCC No. 33694), DH5, DH10, MC1061 (ATCC No. 53338) e CC102). Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é Tuner™ (Novagen), AD494 (Novagen), HMS174 (Novagen), NovaBlue (Novagen), BLR (Novagen), C41 (Lucigen), C43 (Lucigen), Lemo2l (NEB), NiCo2l (NEB), BL21, BL2l (DE3) ou T7 Express (NEB).

[00187] Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma cepa de *E. coli* que fornece um ambiente citoplasmático para a formação de ligações dissulfeto. Por exemplo, o ambiente citoplasmático é alcançado otimizando a via da tioredoxina e/ou glutationa e/ou expressando a isomerase da ligação dissulfeto citosólica. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma cepa de *E. coli* que expressa constitutivamente uma cópia cromossômica de uma isomerase de ligação dissulfeto citosólica (por exemplo, DsbC). Em algumas formas de realização, as células hospedeiras procarióticas são células SHuffle® Express (NEB # C3028) (New England Biolabs). Em algumas formas de realização, as células hospedeiras procarióticas são células SHuffle® T7 (NEB # C3026) ou SHuffle® Express T7 LysY (NEB # C3030). O SHuffle® possui deleções dos genes da glutaredoxina redutase e tioredoxina redutase (Agor AtrxB), que permitem a formação de ligações dissulfeto no citoplasma. Essa combinação de mutações é normalmente letal, mas a letalidade é suprimida por uma mutação no gene que codifica a enzima peroxiroxina (ahpC *). Além disso, o SHuffle® expressa uma versão da isomerase DsbC da ligação dissulfeto periplasmática que não possui sua sequência de sinal, mantendo DsbC no citoplasma. Foi demonstrado que esta enzima age em proteínas com múltiplas ligações dissulfeto para corrigir ligações mal oxidadas e promover o dobramento adequado. Qualquer outra linhagem celular com essas propriedades (por exemplo, fornecer um ambiente citoplasmático para a formação de ligações dissulfeto) pode ser usada para preparar os compostos da revelação. Em

algumas formas de realização, as células hospedeiras procarióticas são Origami™ ou Rosetta-gami™.

[00188] Exemplos de sistema de expressão eucariótica de levedura incluem, mas não estão limitados aos gêneros *Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hansenula* e *Yarrowia.*

[00189] Células hospedeiras de insetos adequadas são descritas, por exemplo, em Kitts e outros, Biotechniques, 14: 810-817 (1993); Lucklow, Curr. Opin. Biotechnol., 4: 564-572 (1993); e Lucklow e outros, J. Virol. 67: 4566-4579 (1993). Células hospedeiras de insetos exemplares incluem Sf-9 e HI5 (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia).

[00190] Exemplos de expressão proteica *in vitro* incluem, mas não estão limitados aos lidados de *E. coli*, lisados de reticulócitos de coelho (RRL), extratos de gérmen de trigo e lisados de células de insetos (como lisados SF9 ou SF21). O sistema de expressão isento de células é a produção de proteínas recombinantes nas quais a síntese protéica ocorre nos lisados celulares e não nas células cultivadas. Um sistema de expressão sem células pode fornecer várias vantagens e recursos que complementam os métodos tradicionais *in vivo*, como velocidade de produção mais rápida, porque não requer transfecção de genes, cultura de células ou purificação extensiva de proteínas.

TRATAMENTOS DE COMBINAÇÃO COM OUTROS FÁRMACOS

[00191] As proteínas de fusão da revelação podem ser administradas sozinhas ou em combinação com outros fármacos (por exemplo, como um adjuvante). Por exemplo,

vários quimioterapêuticos, especialmente fármacos antineoplásicos, estão disponíveis para combinação com as proteínas de fusão da revelação. A maioria dos fármacos quimioterapêuticos pode ser dividida em agentes alquilantes, antimetabólitos, antraciclinas, alcaloides vegetais, inibidores da topoisomerase, anticorpos e outros agentes antitumorais.

[00192] Conforme usado neste documento, a administração adjuvante ou combinada (coadministração) inclui a administração simultânea de uma proteína de fusão e outro medicamento na mesma ou diferente forma de dosagem, ou administração separada de proteína de fusão e outro medicamento (por exemplo, administração sequencial).

[00193] Em determinadas formas de realização, as proteínas de fusão da revelação são coadministradas com um medicamento antineoplásico que danifica o DNA ou interfere no reparo do DNA. Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão da revelação e um fármaco antineoplásico agem sinergicamente. Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão da revelação aumentam a sensibilidade de uma célula ao medicamento antineoplásico, por exemplo, em pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% ou 50% Exemplos de fármacos antineoplásicos que danificam o DNA ou a reparação do DNA de inibição incluem carboplatina, carmustina, clorambucilo, cisplatina, ciclofosfamida, dacarbazina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, mitoxantrona, oxaliplatina, a procarbazina, a temozolomida, e não limitativos valrubicina. Em algumas formas de realização, o fármaco antineoplásico é temozolomida, que é

um agente alquilante prejudicial ao DNA comumente usado contra glioblastomas. Em algumas formas de realização, o medicamento antineoplásico é um inibidor de PARP (por exemplo, KU0058948, ABT-888 (veliparibe), olaparibe, KU-59436, AZD-2281, AG-014699, BSI-201, BGP-15, INO-1001, ONO - 2231), que inibe um passo no reparo por excisão de base de danos no DNA. Em algumas formas de realização, o fármaco antineoplásico é um inibidor da histona desacetilase (por exemplo, Vorinostat; Romidepsina; Chidamida; Panobinostat; ácido valpróico; Belinostat;; Mocetinostat; Abexinostat; Entinostat; SB939 (pracinostat); Resminostat; Givinid™); CUDC-10; CHR-2845 (tefinostat); CHR-3996; 4SC-202; CG200745; ACY-1215 (rocilinostat); ME-344; sulforafano), que suprime o reparo do DNA no nível transcricional e interrompe a estrutura da cromatina. Em algumas formas de realização, o medicamento antineoplásico é um inibidor de proteassoma (por exemplo, Bortezomibe; Carfilzomibe; Epoxomicina; Ixazomibe; Salinosporamida A), que suprime o reparo do DNA, interrompendo o metabolismo da ubiquitina na célula. A ubiquitina é uma molécula de sinalização que regula o reparo do DNA. Em algumas formas de realização, o medicamento antineoplásico é um inibidor de cinase (por exemplo, um inibidor de ATM (CP466722 ou KU- 55933); um inibidor de CHK 1 (XL-844, UCN-01, AZD7762 ou PF00477736) ou um inibidor de CHK 2 (XL-844, AZD7762 ou PF00477736)), que suprime o reparo do DNA alterando as vias de sinalização da resposta a danos no DNA.

[00194] Exemplos adicionais de fármacos antineoplásicos que podem ser combinados com as proteínas de fusão da revelação incluem, mas não estão limitados aos

agentes alquilantes (como temozolomida, cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, dacarbazina, lomustina, carmustina, procarbazina, clorambucil e ifosfamida), antimetabólitos (como gemcitabina, metotrexato, citosina arabinosídeo, fludarabina e floxuridina), antimitóticos, alcaloides da vinca, como vincristina, vinblastina, linhas de vinorelcina e vorindindina (incluindo a gencitabina, metotrexato, citosina arabinosídeo, fludarabina e floxuridina), valrubicina, idarubicina e epirrubicina, bem como actinomicinas como a actinomicina D), antibióticos citotóxicos (incluindo mitomicina, plicamicina e bleomicina) e inibidores da topoisomerase (incluindo camptotecinas como topotecano e derivados de epipodofilotoxinas etipidase, fosfato e teniposídeo).

[00195] Exemplos de outros agentes quimioterapêuticos que podem ser administrados em combinação com proteínas de fusão da revelação incluem agentes alquilantes, como tiotepa e ciclofosfamida; alquilssulfonatos, tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas, incluindo altretamina, trietilenemelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiopofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (por exemplo, bulatacina e bulatacinona); delta-9-tetra-hidrocanabinol (dronabinol); beta-lapacona; lapachol; colchicina; ácido betulínico; uma camptotecina (incluindo o topotecano análogo sintético (CPT-ll (irinotecano); acetilcamptotecina, escopolecitina e 9-aminocamptotecina); briostatina; pemetrexed; calistatina;

CC-1065 (incluindo adozelesina, carzelesina e bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida, criptoficinas (por exemplo, criptiofian 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos KW-2189 e CB1-TM1), eleuterobina; pancratistatina; TLK-286; CDP323, um Inibidor de integrina alfa-4 oral; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de nitrogênio, como clorambucila, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiclina, fenesterina, prednimustina, nitrofosfamida, trofosfamida, nitrofosfina, trofosfamida, nitrofosfato de sódio, trofosfamida, nitrofosfato de sódio, trofosfamida, nitrofosfato de sódio, trofosframida, nitrofosfato de sódio; clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimnustina; antibióticos como os antibióticos enediina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama) tudo e caliqueamicina omegall (vide, por exemplo, Nicolaou e outros, Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluindo dinâmica A; uma esperamicina; cromóforo de neocarzinostatina e afins; cromóforos de antibióticos de cromoproteína enedina; aclacinomisinas; actinomicina; autramicina; azaserina; bleomicinas; cactinomicina; carabicina; carminomicina; carzinofilina; cromomicina; dactinomicina; daunorrubicina; detorubicina; 6-diazo-5-oxo-L-norleucina; doxorrubicina (incluindo morfolino-doxorrubicina; cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxombicina, injeção de lipossomas HCl com doxorrubicina HC e desoxidoxorrubicina); epirrubicina; esorubicina; idarrubicina; marcelomicina;

mitomicinas tais como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, guelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina e zorubicina; anti-metabólitos como metotrexato, gencitabina, tegafur, capecitabina, uma epotilona e 5-fluoruracila (5-FU); análogos de ácido fólico, tais como denopterina, metotrexato, pteropterina e trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina e tioguanina; análogos de pirimidina, como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina e imatinib (um derivado de 2-fenilaminopirimidina), bem como outros inibidores de c-Kit; antiadrenais, tais com,o aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracila; amsacrina; bestrabucila; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de gálio; hidroxiureia; lentinano; lonidainina; maitansinóides como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etil-hidrazida; procarbazina; PSK.RTM. complexo de polissacarídeos (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermínio; ácido tenuazônico, triaziquona; 2,2,2-triclorotiletilamina; tricotecenos (por exemplo, toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannustustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman;

gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); tiotepa; taxóides, por exemplo, paclitaxel, formulação de nanopartículas manipuladas com albumina de paclitaxel e docetaxel; cloranbucil; 6- tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; oxaliplatina; leucovovina; vinorelbina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluormetilomitina (DMFO); retinóides, tais como, ácido retinóico; sais, ácidos ou derivados farmacêuticos aceitáveis de qualquer um dos precedentes; bem como combinações de dois ou mais dos itens acima, como CHOP, uma abreviação para uma terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona e FOLFOX, uma abreviação de um regime de tratamento com oxaliplatina combinada com 5-FU e leucovovina. Outros agentes terapêuticos que podem ser utilizados em combinação com as proteínas de fusão da revelação incluem bifosfonatos, como clodronato, NE-58095, ácido zoledronio/zoledronato, alendronato, pamidronato, tiludronato ou risedronato; bem como troxacitabina (al, análogo de 3-dioxolano nucleosídeo citosina), anti-sentido; oligonucleotídeos, particularmente aqueles que inibem a expressão ou genes nas vias de sinalização implicadas na proliferação celular aberrante, como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR); vacinas como a vacina Stimuvax, vacina Theratope e vacinas de terapia genética, por exemplo, vacina Allovectin, vacina Leavectin e vacina Vaxid; inibidor da topoisomerase 1; um anti-estrogênio como

fulvestrant; um inibidor de Kit como imatinibe ou EXEL-0862 (um inibidor de tirosina quinase); Inibidor de EGFR, como erlotinibe ou cetuximabe; um inibidor anti-VEGF como o bevacizumab; arinotecano; rmRH; lapatinib e ditosilato de lapatinib (um inibidor de molécula pequena de tirosina-quinase dupla ErbB-2 e EGFR, também conhecido como GW572016); 17AAG (derivado de geldanamicina que é uma proteína de choque térmico (Hsp) 90 veneno) e sais, ácidos ou derivados farmacêuticos aceitáveis de qualquer dos itens acima.

[00196] Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão ou composições farmacêuticas reveladas neste documento são coadministradas com 5-fluoruracila (5-FU). Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão ou suas composições farmacêuticas são co-administradas com um regime contendo 5-FU, por exemplo: FOLFUHD (5-FU e leucovorina, sLV5FU2 (5-FU e leucovorina), IFL (irinotecano, leucovorina e 5-FU), FLOX (5-FU, leucovorina e oxaliplatina), mFOLFOX6 (oxaliplatina, leucovorina e 5-FU), FOLFOX4 (oxaliplatina, leucovorina e 5-FU), FOLFOX7 (oxaliplatina, leucovorina), FOLFIRI (irinotecano, leucovorina e 5-FU), FOLFOXIRI (irinotecano, oxaliplatina, leucovorina e 5-FU), FOLFIRINOX (cálcio com leucovorina, fluorouracil, cloridrato de irinotecano e metil-fosfato); 5-FU). Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão ou suas composições farmacêuticas são coadministradas com um regime contendo 5-FC. Por exemplo, em algumas formas de realização, o componente 5-FU de qualquer um dos regimes acima mencionados com 5-FU é substituído por 5-FC (por exemplo, 5-FC e leucovorina; 5-FC, leucovorina e

irinotecano; 5-FC, leucovorina e oxaliplatina; 5-FU, leucovorina, irinotecano e oxaliplatina; 5-FU, leucovorina cálcica, cloridrato de irinotecano e oxaliplatina; 5-FC, ciclofosfamida e metotrexato).

[00197] Em algumas formas de realização, proteínas de fusão ou composições farmacêuticas da revelação podem ser combinadas ou coadministradas com uma ou mais substâncias que potencializam o efeito citotóxico do 5-FU. As substâncias que potencializam o efeito citotóxico do 5-FU incluem, mas não estão limitadas aos fármacos que inibem enzimas da biossíntese de novo das pirimidinas; e fármacos, como Leucovorin (Waxman e outros, 1982, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18, 685-692), que, na presença do produto do metabolismo da 5-FU (5-FdUMP), aumenta a inibição da timidilato sintase, resultando em uma diminuição no pool de dTMP, necessário para a replicação e fármacos como o metotrexato (Cadman e outros, 1979, Science 250, 1135-1137) que, inibindo a diidrofolato redutase e aumentando o pool de PRPP (fosforibosilpirofosfato), provocam um aumento na incorporação de 5-FU no RNA celular. Em algumas formas de realização, as substâncias que potencializam o efeito citotóxico do 5-FU inibem a degradação do 5-FU. Por exemplo, em algumas formas de realização, a substância é Gimeracila. Em algumas formas de realização, as substâncias que potencializam o efeito citotóxico do 5-FU diminuem os efeitos colaterais do 5-FU. Por exemplo, em algumas formas de realização, a substância é Oteracil potássio. Em algumas formas de realização, as substâncias que potencializam o efeito citotóxico do 5-FU inibem o metabolismo do 5-FU inibindo a di-hidropirimidina

desidrogenase. Por exemplo, em algumas formas de realização, a substância é uracila.

MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO

[00198] A administra das proteínas de fusão ou composições farmacêuticas da revelação pode ser conduzida de diferentes maneiras, incluindo administração oral, subcutânea, intravenosa, intraperitoneal ou intratumoral. Outras vias de administração e administra incluem intra-articular, intra-arterial, intramuscular, parentérica, subcutânea, intra-pleural, tópica, dérmica, intradérmica, transdérmica, parentérica, p. transmucosa, intracraniana, intraespinhal, mucosa, respiratória, intranasal, via intubação, intrapulmonar, instilação intrapulmonar, bucal, sublingual, intravascular, intratecal, intracavidade, iontoforética, intra-ocular, oftalmológica, intraglandular, intra-orgânica e intralinfática.

[00199] Cada via de liberação/administração tem demandas diferentes para uma formulação de proteína de fusão de acordo com a revelação, e as formulações podem ser preparadas rotineiramente por um versado na técnica. Por exemplo, com a aplicação oral ou a injeção intraperitoneal, a proteína de fusão sdAb-CD requer resistência a condições extremas (isto é, proteases e/ou pH ácido). Se necessário, as proteínas de fusão podem tornar-se resistentes às proteases pela adaptação da sequência ou pela introdução de uma ligação dissulfeto adicional, a fim de melhorar a resistência à pepsina e quimotripsina, como é bem conhecido na arte. Para injeção intravenosa, a estabilidade no soro pode ser importante. A maioria dos sdAbs combinados com

domínios efetores ou nanopartículas foram descritos como muito estáveis no soro.

[00200] De acordo com algumas formas de realização, o uso terapêutico ou o método de tratamento compreende uma etapa adicional na qual são administradas ao indivíduo ou célula quantidades farmaceuticamente aceitáveis de um pró-fármaco, como um análogo da citosina, em particular o 5-FC. Como ilustração não limitativa, é possível usar uma dose de 50 a 1000 mg/kg/dia, ou uma dose de 500 mg/kg/dia ou uma dose de 200 mg/kg/dia, uma vez a cada dia ou mais de uma vez por dia. Em algumas formas de realização, o método inclui pelo menos uma primeira dose de carga de 5-FC suficiente para obter uma concentração sérica de cerca de 1-200 (por exemplo, 10-100) micrograma/mL dentro de 1-2 dias após a administração. Em algumas formas de realização, o pró-fármaco é administrado de acordo com a prática padrão (por exemplo, oralmente, sistematicamente), com a administração ocorrendo após a administração de uma proteína de fusão aqui revelada. Em algumas formas de realização, o pró-fármaco é administrado por via oral. Em algumas formas de realização, o pró-fármaco é administrado em uma dose única. Em algumas formas de realização, o pró-fármaco é administrado em doses que são repetidas por um tempo suficiente para permitir que o metabolito tóxico seja produzido dentro do organismo ou célula hospedeira.

[00201] Em algumas formas de realização, o pró-fármaco é um composto que pode ser convertido in vivo para fornecer uma forma biologicamente, farmaceuticamente ou terapeuticamente ativa de 5-FC. Tais compostos fotoativáveis podem compreender um ligante fotossensível

que é clivável por irradiação com, por exemplo, uma luz UV (incluindo luzes implantadas dentro de um local de tumor que pode ser ativado remotamente ou temporalmente).

[00202] Em algumas formas de realização, um análogo de citosina é administrado em vez de 5- FC. Os análogos de citosina que podem ser substratos para a citosina desaminase incluem citosinas halogenadas e o pró-fármaco 5-fluorcitosina (5-FC) (que é ativada por CD para 5-fluoruracila (5-FU)). Além disso, podem ser usadas formulações de liberação prolongada de 5-FC (por exemplo, Toca FC).

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[00203] A revelação fornece composições farmacêuticas compreendendo uma ou mais das proteínas de fusão aqui reveladas. Em algumas formas de realização, a composição farmacêutica compreende uma ou mais das proteínas de fusão aqui reveladas e um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis. As composições farmacêuticas compreendendo uma proteína de fusão da revelação e quaisquer modificações pós-traducionais da mesma e um excipiente farmaceuticamente aceitável também estão dentro do escopo desta revelação e podem ser preparadas usando métodos conhecidos na técnica. Excipientes adequados são bem conhecidos na técnica. A escolha do excipiente será determinada, em parte, pelo local específico no qual a composição pode ser administrada e pelo método específico usado para administrar a composição. A composição pode ser opcionalmente estéril. A composição pode ser congelada ou liofilizada para armazenamento e reconstituída em um veículo estéril adequado antes do uso. As composições podem

ser geradas de acordo com técnicas convencionais descritas em, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22a Edição, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2013) e quaisquer outras edições.

[00204] O termo "excipiente" se refere amplamente a qualquer componente que não seja o (s) ingrediente (s) terapêutico (s) ativo (s). O excipiente pode ser uma substância inerte, uma substância inativa e/ou uma substância não medicinalmente ativa. O excipiente pode servir a vários propósitos, por exemplo, como transportador, veículo, diluente, auxiliar para comprimidos e/ou para melhorar a administração e/ou absorção da substância ativa.

[00205] Em algumas formas de realização, as composições farmacêuticas da revelação são preparadas para ter determinadas estabilidades (estabilidade física e/ou química). O termo "estabilidade física" se refere à tendência de um polipeptídeo ou proteína de formar agregados biologicamente inativos e/ou insolúveis como resultado da exposição ao estresse termomecânico e/ou interação com interfaces e superfícies desestabilizantes (como superfícies hidrofóbicas). A estabilidade física de uma formulação de proteína aquosa pode ser avaliada por meio de inspeção visual e/ou medições de turbidez após exposição a estresse mecânico/físico (por exemplo, agitação) a diferentes temperaturas por vários períodos de tempo. Alternativamente, a estabilidade física pode ser avaliada usando um agente espectroscópico ou sonda do status conformacional da proteína, como por exemplo, sondas de tioflavina T ou "adesivo hidrofóbico".

[00206] O termo "estabilidade química" se refere a alterações químicas (em particular covalentes) no polipeptídeo ou na estrutura da proteína, levando à formação de produtos de degradação química com potencial de potência biológica reduzida e/ou aumento do efeito imunogênico em comparação com o intacto proteína. A estabilidade química pode ser avaliada medindo a quantidade de produtos de degradação química em vários momentos após a exposição a diferentes condições ambientais, por exemplo, por SEC-HPLC e/ou RP-HPLC.

[00207] As proteínas de fusão da revelação podem ser utilizadas terapeuticamente como formulações farmacêuticas. O termo "formulação farmacêutica" se refere a uma preparação que está de forma a permitir que a atividade biológica do ingrediente ativo seja eficaz, em que a formulação não compreende componentes adicionais que são inaceitavelmente tóxicos para um indivíduo a quem a formulação seria administrado. Em algumas formas de realização, as formulações farmacêuticas são estéreis.

[00208] Em algumas formas de realização, uma composição farmacêutica ou formulação farmacêutica pode ser uma solução, emulsão ou suspensão (por exemplo, incorporada em micropartículas, lipossomas ou células). Tipicamente, uma quantidade apropriada de um sal farmaceuticamente aceitável é usada na composição ou formulação para torná-lo isotônico. Exemplos de transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a solução salina, solução de Ringer e solução de dextrose. O pH da solução é preferencialmente de cerca de 5 a cerca de 8, e mais preferencialmente de cerca de 7 a cerca de 7,5. As

composições ou formulações farmacêuticas podem incluir veículos, espessantes, diluentes, tampões, conservantes e/ou agentes tensoativos. Os veículos adequados incluem preparações de liberação sustentada, tais como matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo a proteína de fusão da revelação, cujas matrizes estão na forma de partículas moldadas, por exemplo, filmes, lipossomas ou micropartículas. Será evidente para aqueles versados na técnica que certos veículos podem ser mais preferíveis dependendo, por exemplo, da via de liberação e concentração da composição que está sendo administrada. As composições ou formulações farmacêuticas também podem incluir um ou mais ingredientes ativos adicionais, tais como agentes citotóxicos, agentes citostáticos, agentes quimioterapêuticos, agentes antimicrobianos, agentes anti-inflamatórios e anestésicos.

[00209] Para auxiliar a dissolução das proteínas de fusão da revelação no ambiente aquoso, um surfactante pode ser adicionado como um agente umectante. Os surfactantes podem incluir detergentes aniônicos, como lauril sulfato de sódio, dioctil sódio, sulfossuccinato e dioctil sódio sulfonato. Detergentes catiônicos podem ser usados e podem incluir cloreto de benzalcônio ou cloreto de benzetônio. Detergentes não iônicos que poderiam ser usados na formulação como surfactantes incluem, mas não estão limitados a, lauromacrogol 400; estearato de polioxila 40; óleo de rícino hidrogenado com polioxietileno 10, 50 ou 60; monoestearato de glicerol; polissorbato 20, 40, 60, 65 ou 80; éster de ácido graxo de sacarose; metilcelulose; e carboximetilcelulose. Estes surfactantes podem estar

presentes na composição farmacêutica ou na formulação da proteína de fusão, isoladamente ou como uma mistura em diferentes proporções. Aditivos que podem melhorar a captação de peptídeos podem ser incluídos em uma composição farmacêutica ou formulação da revelação. Por exemplo, em algumas formas de realização, a composição ou formulação inclui um ou mais dos ácidos graxos ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolênico.

MÉTODOS DE USO

[00210] As proteínas de fusão da revelação podem ser usadas, por exemplo, no tratamento de doenças proliferativas (cânceres/tumores, reestenose, glaucoma, cicatrização). Em alguns aspectos, a revelação se refere a um método que compreende a administração de uma proteína de fusão ou composição farmacêutica ou formulação da mesma a um indivíduo com câncer ou qualquer doença revelada neste documento, quando a doença é tratada no indivíduo. Além dos usos terapêuticos, as proteínas de fusão, composições farmacêuticas e/ou formulações farmacêuticas descritas no presente documento podem ser usadas em aplicações de diagnóstico ou pesquisa.

[00211] Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão da revelação, ou composição farmacêutica ou formulações das mesmas, podem ser usadas para tratar qualquer câncer conhecido na técnica, como câncer de cólon, câncer de esôfago, câncer de estômago, câncer de pâncreas, câncer de mama, carcinoma basocelular, doença de Bowen e câncer cervical. Em algumas formas de realização, os compostos da revelação podem ser utilizados para tratar a neoplasia escamosa da superfície ocular. Em algumas formas

de realização, as proteínas de fusão reveladas, composições farmacêuticas e/ou formulações farmacêuticas podem ser usadas para tratar melanoma, carcinoma de células renais, câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer de cólon, câncer de vesícula biliar, câncer de laringe, câncer de fígado, câncer de tireoide, câncer de estômago, câncer de glândula salivar, câncer de próstata, câncer de pâncreas, colangiocarcinoma, câncer de esôfago, câncer de osso, câncer de endométrio, câncer de ovário, sarcoma de tecidos moles ou carcinoma de células de Merkel. Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão reveladas, composições farmacêuticas e/ou formulações farmacêuticas podem ser usadas para tratar um tumor sólido. Em algumas formas de realização, o tumor sólido é câncer de cólon, câncer colorretal, câncer de pâncreas ou câncer de cabeça e pescoço.

[00212] Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão reveladas, composições farmacêuticas e/ou formulações farmacêuticas podem ser usadas para tratar a queratose actínica. Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão reveladas, composições farmacêuticas e/ou formulações farmacêuticas podem ser usadas como uma terapia adjuvante em cirurgias oculares e/ou periorbitais. Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão reveladas, composições farmacêuticas e/ou formulações farmacêuticas podem ser usadas no tratamento de cicatrizes hipertróficas (HTSs) e/ou queloides.

[00213] O termo "tratamento" (ou "tratar") se refere ao tratamento médico de um paciente com a intenção de curar, melhorar ou estabilizar uma doença. Este termo

inclui tratamento ativo, isto é, tratamento direcionado especificamente para a melhoria de uma doença, condição patológica ou distúrbio, e também inclui tratamento causal, isto é, tratamento direcionado para a remoção da causa da doença associada, condição patológica ou transtorno. Além disso, esse termo inclui tratamento paliativo, ou seja, tratamento destinado ao alívio dos sintomas, e não à cura da doença, condição patológica ou distúrbio; tratamento preventivo, isto é, tratamento direcionado a minimizar ou inibir parcial ou completamente o desenvolvimento da doença, condição patológica ou distúrbio associada; e/ou tratamento de suporte, ou seja, tratamento empregado para suplementar outra terapia específica direcionada para a melhoria da doença, condição patológica ou distúrbio associada.

[00214] O termo "terapeuticamente eficaz" significa que a quantidade de proteína, composição ou formulação utilizada é de quantidade suficiente para melhorar uma ou mais causas ou sintomas de uma doença ou transtorno. Essa melhoria requer apenas uma redução ou alteração, não necessariamente eliminação. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína, composição ou formulação para o tratamento de câncer é preferencialmente uma quantidade suficiente para causar regressão do tumor ou sensibilizar um tumor para radiação ou quimioterapia. A quantidade das proteínas de fusão reveladas, composições farmacêuticas e/ou formulações farmacêuticas necessárias para uso no tratamento variará não apenas com o sdAb específico (ou sua variante funcional) e a proteína de fusão selecionada, mas também com a via de liberação, a

natureza da condição a ser tratada, idade e condição do paciente, entre outros fatores, e ficará a critério do médico ou clínico assistente. Além disso, a dosagem das proteínas de fusão reveladas, composições farmacêuticas e/ou formulações farmacêuticas pode variar dependendo da célula, tumor, tecido, enxerto ou órgão alvo.

[00215] Os médicos geralmente poderão determinar uma dose adequada, dependendo dos fatores mencionados neste documento. Também ficará claro que, em casos específicos, o clínico pode optar por desviar-se desses valores, por exemplo, com base nos fatores citados acima e em seu julgamento especializado. Geralmente, algumas orientações sobre as quantidades a serem administradas podem ser obtidas a partir das quantidades geralmente administradas para anticorpos convencionais comparáveis ou fragmentos de anticorpos contra o mesmo alvo administrado basicamente pela mesma via, levando em consideração as diferenças de afinidade/avidez, eficácia, biodistribuição, meia-vida e fatores semelhantes bem conhecidos do especialista. Por exemplo, as proteínas de fusão da revelação podem geralmente ser administradas em uma quantidade entre 1 grama e 0,01 micrograma por kg de peso corporal por dia, preferencialmente entre 0,1 grama e 0,1 micrograma por kg de peso corporal por dia, como cerca de 1, 10, 100 ou 1.000 microgramas por kg de peso corporal por dia, continuamente (por exemplo, por infusão), como uma dose diária única ou como várias doses divididas durante o dia. Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão da revelação são administradas em uma quantidade de cerca de 10 mg/kg a cerca de 60 mg/kg. Em algumas formas de realização, as

proteínas de fusão da revelação são administradas em uma quantidade de cerca de 10 mg/kg/dia a cerca de 60 mg/kg/dia.

[00216] Outras doses adequadas para as proteínas de fusão da revelação podem estar, por exemplo, na faixa de 1 mg/kg a 60 mg/kg de peso corporal de animais ou humanos; no entanto, doses abaixo ou acima desse intervalo exemplar estão dentro do escopo da invenção. A dose parenteral diária pode ser de cerca de 0,00001 mg/kg a cerca de 20 ou cerca de 40 mg/kg do peso corporal total (por exemplo, cerca de 0,001 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 5 mg/kg, cerca de 10 mg/kg, cerca de 100 mg/kg, cerca de 500 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 5 mg/kg, cerca de 10 mg/kg ou um intervalo definido por dois dos valores precedentes, de preferência de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg de peso corporal total (por exemplo, cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 50 mg/kg, cerca de 150 mg/kg, cerca de 300 mg/kg, cerca de 750 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 5 mg/kg ou um intervalo definido por dois dos valores precedentes, mais preferencialmente de cerca de 1 mg/kg a 5 mg/kg do peso corporal total (por exemplo, cerca de 3 mg/kg, cerca de 15 mg/kg, cerca de 75 mg/kg, cerca de 300 mg/kg, cerca de 900 mg/kg, cerca de 2 mg/kg, cerca de 4 mg/kg ou um intervalo definido por dois dos valores precedentes) e ainda mais preferencialmente de cerca de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal por dia (por exemplo, cerca de 1 mg/kg, cerca de 2,5 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 6 mg/kg, cerca de 9 mg/kg, cerca de 11 mg/kg, cerca de 13 mg/kg ou um intervalo definido por dois dos valores

precedentes). A eficácia terapêutica ou profilática pode ser monitorada por avaliação periódica dos pacientes tratados. Para administrações repetidas por vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento pode ser repetido até que ocorra uma supressão desejada dos sintomas da doença. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis e estão dentro do escopo da revelação. Por exemplo, a dosagem desejada pode ser administrada por uma única administração em bolus da composição, por várias administrações em bolus da composição ou por administração de infusão contínua das composições da revelação. Outros métodos de administração que podem ser utilizados com as proteínas de fusão aqui reveladas são exemplificados em outras partes deste documento.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Construção de plasmídeos de expressão em mamíferos

[00217] Os plasmídeos de expressão de proteínas de fusão com CD foram construídos por técnicas de DNA recombinante rotineiras na técnica. Os métodos de construção/desenho de algum plasmídeo de expressão representado são descritos no presente documento.

[00218] (1) Plasmídeo de expressão de Rituxan-CD-CD

[00219] O projeto de uma proteína de fusão Rituxan-CD-CD é mostrado na figura 1 A. A sequência de ácidos nucleicos da cadeia pesada de Rituxan, cadeia leve de Rituxan e citosina desaminase de levedura pode ser sintetizada por síntese gênica. O fragmento de codificação contendo SP-RituxanHC-CD-ligante-CD (SEQ ID NO: 89) e SP-

RituxanLC (SEQ ID NO: 90) foram gerados por sobreposição de PCR. O fragmento SP-RituxanHC-CD-linker-CD e SP-RituxanLC foram então clonados no vetor pCHO1.0 via site AvrII/BstZ 171 e site EcoRV/PacI, respectivamente. (*SP: peptídeo de sinal).

[00220] (2) Plasmídeo de expressão de Herceptina-CD

[00221] O projeto de uma proteína de fusão Herceptina-CD é mostrado na figura 1B. A sequência de ácidos nucleicos da região variável de Herceptina e da citosina desaminase de levedura pode ser sintetizada por síntese gênica. Os fragmentos de codificação contendo SP-HerceptinHC-CD (SEQ ID NO: 91) e SP-HerceptinLC (SEQ ID NO: 92) foram gerados por sobreposição de PCR. Os fragmentos SP-HerceptinHC-CD e SP-HerceptinLC foram então clonados no vetor pCHO1.0 via site AvrII/BstZ 171 e site EcoRV/PacI, respectivamente.

Exemplo 2. Produção de Rituxan-CD-CD e Herceptina-CD em células de mamíferos

[00222] Para a produção da proteína de expressão em mamíferos, o Rituxan-CD-CD e o Herceptina-CD foram transitoriamente expressos por células CHO-S™ (Thermo) usando reagente FreeStyle Max™ de acordo com o protocolo de transfecção do FreeStyle Max™. Os sobrenadantes foram colhidos 72 horas após a transfecção. Os sobrenadantes foram então: (1) quantificados por ELISA para determinar o título da proteína, (2) purificados pela proteína A e o padrão de expressão verificado por PAGE não redutora e (3) concentrados para análise da atividade da CD.

[00223] Os títulos de expressão de Rituxan-CD-CD e Herceptina CD foram de 0,002 micrograma/mL e 0,5 micrograma/mL, respectivamente. Ambas as proteínas de fusão tiveram atividade CD. O rituxan-CD-CD foi quase não detectável por PAGE, mesmo após a purificação da proteína A (dados não mostrados). Observou-se que o Herceptina-CD foi agregado como multímero quando analisado por PAGE não redutora (figura 1B).

Exemplo 3. Construção de plasmídeos de expressão de *E. coli*

[00224] A sequência de codificação para cada proteína de fusão compreende dois componentes principais, um que codifica o fragmento de reconhecimento de antígeno (domínio de destino), como sdAb, fragmento de ligação ao antígeno ou endostatina; e um que codifica o fragmento de citosina desaminase de levedura. Uma sequência de codificação que codifica uma sequência de peptídeo ligante conectou os componentes principais, de modo que, quando expresso, o ligante não interfere com a função do componente de proteína do domínio de alvejamento ou do componente CD. O plasmídeo de expressão é simplificado no esquema mostrado na figura 2A.

[00225] (1) Plasmídeo de expressão com anticorpo y-CD e domínio único

[00226] As sequências de ácidos nucleicos de sdAb e citosina desaminase de levedura podem ser sintetizadas por síntese gênica. O fragmento de codificação das proteínas de fusão sdAb-CD foi obtido por sobreposição de PCR usando iniciadores específicos. A sequência do peptídeo ligante entre o sdAb e o CD foi (GGGGS) 3 (SEQ ID NO: 188).

Os fragmentos foram clonados em um vetor pET28a (Novagen) através dos locais Xbal e Xhol (figura 2A). Variantes de proteína de fusão com mutação (s) CD ou mutação (s) de VHH foram geradas por sobreposição de PCR.

[00227] (2) Plasmídeo de expressão de CD-fragmento de ligação ao antígeno

[00228] As sequências de ácidos nucleicos da citosina desaminase de levedura foram sintetizadas por síntese genética. O fragmento de codificação do fragmento de ligação ao antígeno-CD (SEQ ID NOs: 81-84) foi obtido por extensão de PCR usando iniciadores específicos. A sequência do peptídeo ligante entre o fragmento de ligação ao antígeno e a CD foi $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 188). Os fragmentos foram clonados no vetor pET28a (Novagen) através dos locais Xbal e Xhol (figura 2A).

[00229] (3) Plasmídeo de expressão de endostatina-CD

[00230] As sequências de ácidos nucleicos da endostatina e citosina desaminase de levedura foram sintetizadas por síntese gênica. O fragmento de codificação das proteínas de fusão da endostatina-CD (SEQ ID NO: 85) foi obtido por sobreposição de PCR usando iniciadores específicos. A sequência do peptídeo ligante colocada entre o fragmento de ligação ao antígeno e o CD foi (GGGGS) 3 (SEQ ID NO: 188). Os fragmentos foram então clonados no vetor pET28a (Novagen) via locais Xbal e Xhol (figura 2A).

Exemplo 4. Produção de proteínas de fusão CD em E. coli

[00231] Para produção, o plasmídeo de expressão foi transformado em SHuffle® células de *E. coli* competentes

T7 ou que expressam T7 (New England Biolabs) por um procedimento de transformação padrão.

[00232] Para estimativa piloto das características das proteínas, as proteínas recombinantes foram expressas e purificadas em uma escala de produção de cerca de 300 mL. Para expressão da proteína, os transformantes atualizados foram inoculados na diluição de 1: 100 no meio de seleção a 30°C (células SHuffle® T7 rxpressam T7) ou a 37°C (células expressam T7) até OD600 atingir 0,4 - 0,8 (I_0). Foi adicionado IPTG (região Uni) a 0,4 mM para induzir a expressão da proteína. Para células que expressam T7, a cultura induzida foi incubada a 37°C por 5 horas. Para células SHuffle® T7 Express, após a temperatura de indução para produção ser de 25°C ou 30°C, a temperatura para produção era de 25°. A temperatura de indução era de 30°C. Cinco horas após a indução (U), a cultura foi colhida e ressuspensa em PBS para lise celular por sonicação. As frações solúveis e insolúveis foram coletadas do lisado celular separadamente. A fração solúvel do lisado celular foi primeiro incubada com esferas de Ni Sepharose (GE Healthcare) à temperatura ambiente durante 1 hora. Após a incubação, as esferas de Ni (GE) foram lavadas com gradiente de imidazol 20 mM, 40 mM e 80 mM (W1, W2 e W3, respectivamente). Cada proteína de fusão foi eluída com tampão contendo imidazol 150 mM e 250 mM (El e E2). As amostras de cada etapa foram analisadas por SDS-PAGE para avaliar a expressão e o perfil de purificação. As proteínas recombinantes purificadas foram coletadas e trocadas para PBS com glicerol a 5% para análise de SDS-PAGE, SEC-HPLC, atividade CD e atividade de ligação ao antígeno. O título

de expressão, características físico-químicas, atividade de CD e atividade de ligação ao antígeno de todas as proteínas recombinantes foram estimados e estão resumidos na figura 2B. Os perfis de expressão são exemplificados na figura 2C e figura 2D. A análise de SDS-PAGE, SEC-HPLC, atividade CD e atividade de ligação ao antígeno do sdAb-CD purificado é exemplificada nas figuras 3, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A e 6B.

[00233] Os resultados mostram que as proteínas de fusão sdAb-CD são expressas principalmente na forma solúvel e exibem perfil de pureza aceitável durante a análise por SDS-PAGE e SEC-HPLC. O título das proteínas de fusão sdAb-CD durante a produção em pequena escala foi de cerca de 10 micrograma/mL ou excedeu, o título pode ser aumentado ainda mais para 160-400 micrograma/L na produção em larga escala e pode ser aumentado para > 1 g/L após otimização de processos adequados à produção industrial. A atividade de ligação ao antígeno e a atividade da CD foram mantidas em todas as proteínas de fusão sdAb-CD.

[00234] Em contraste, a endostatina-CD não pôde ser expressa em forma solúvel, portanto, não é adequada para produção industrial. As proteínas de fusão CD-fragmento de ligação ao antígeno, embora com menor peso molecular, pareciam ser expressas na forma solúvel. A maioria das proteínas de fusão do fragmento de ligação ao antígeno-CD foi agregada na forma de dímero ou multimero, e os fragmentos de ligação ao antígeno perderam sua atividade de ligação ao antígeno quando fundidos com o CD.

[00235] Mais de dez proteínas de fusão sdAb-CD e cinco antígenos direcionados foram testados, e os dados mostraram que o sdAb é um fragmento de ligação a antígeno

adequado para fusão com CD, com sdAb e CD mantendo sua atividade biológica.

Exemplo 5. Estudo de estabilidade de sdAb-CD produzido a partir de diferentes linhagens de *E. coli*

[00236] Os plasmídeos de expressão de 3VGR19-CD-H foram transformados em expressão de T7 SHuffle® T7 e *E. coli* competente de expressão de T7, respectivamente. Os dados sugeriram que o perfil de expressão de 3 VGR19-CD-H na expressão de T7 SHuffle® T7 e expressão de T7 era semelhante (figura 8).

[00237] As proteínas de fusão 3VGR19-CD-H, expressas a partir de expressão de T7 SHuffle® T7 e *E. coli* competente de expressão de T7 foram purificadas e dialisadas nos seguintes quatro tampões a 3 micrograma/mL: (1) PBS (2) glicerol a 1% em PBS (3)) glicerol a 5% em PBS (4) manitol a 3% em PBS. As aparências da proteína purificada em cada tampão foram observadas após incubação a 37°C por 3 horas, 37°C por 8 horas e 4°C por 1 semana e resumidas na Tabela 1. O número de "+" indica o nível de turbidez. "+/-" significa que uma agregação muito menor foi observada. Os resultados mostraram que uma grande quantidade de precipitações foi observada em 3VGR19-CD-H expresso a partir de células de expressão de T7, mas não em células de expressa de T7 SHuffle®.

Tabela 1. Estabilidade do sdAb-CD produzido a partir da expressão de T7 e expressão de T7 SHuffle® T7

Turbidez	**Expressão de T7**				**Expressão de T7 SHuffie®**			
Tampão	**1**	**2**	**3**	**4**	**1**	**2**	**3**	**4**

37°C, 3 horas	+++++	+++++	+++++	+++++	-	-	-	-
37°C, 8 horas	+++++	+++++	+++++	+++++	-	-	-	-
4°C, 1 semana	+++	+++	+	++	+/-	+/-	+/-	+/-

Exemplo 6. Fermentação em batelada de alimentação de 5 litros de proteínas de fusão sdAb-CD

[00238] Para avaliar a produção de proteínas de fusão sdAb-CD da revelação em condições de biorreator, foi realizada uma fermentação de 5L em batelada de fermentação. As células congeladas foram inoculadas em 2 mL de meio de seleção a 30°C por 4-6 horas e, em seguida, inoculadas a uma diluição de 1: 1.000 no meio de seleção de 200 mL como cultura de sementes. No dia seguinte, a cultura de sementes foi inoculada no fermentador de 5 litros. A temperatura foi ajustada em 30°C, pH em 7,2 + 0,1, DO em 25%, fluxo de gás em 1-1,5 vvm. A alimentação foi iniciada quando a glicose estava abaixo de 0,3 g/L, e a taxa de alimentação foi ajustada para manter a glicose em 0,5-1 g/L. Quando o OD600 atingiu mais de 60, foi adicionado IPTG 0,4 mM para induzir a expressão da proteína. A batelada alimentada foi colhida quando as células atingiram a fase estacionária. Finalmente, o processo de fermentação foi interrompido quando atingiu a fase estacionária. O título de produção de sdAb-CD após a purificação foi de cerca de 160-400 micrograma/L. O título de produção do TC4 pode aumentar para 1-1,3 g/L após a otimização do processo.

Exemplo 7. Purificação em larga escala das proteínas de fusão sdAb-CD

[00239] Proteínas de fusão com marcador HIS

[00240] O sedimento celular foi ressuspenso com um tampão composto de TrisHCl 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM e glicerol a 5%, pH 8,0 e homogeneizado pelo homogeneizador (APV2000) duas vezes a 850-950 bar por menos de 10 minutos. O homogenato resultante foi clarificado por centrifugação a 22.000 xg durante 60 minutos a 4°C e filtrado. O lisado celular foi então aplicado a um FPLC com uma coluna Ni Sepharose seguido por uma coluna Q-Sepharose de troca iônica. O lisado celular foi carregado na coluna Ni Sepharose com TrisHCl 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM e glicerol a 5%, pH 8,0 e depois eluído com um gradiente de imidazol 0-500 mM em TrisHCl 20 mM, 0,5 M NaCl e glicerol a 5%, pH 8,0. O eluente foi carregado na coluna Q-Sepharose de troca iônica com TrisHCl 20 mM, NaCl 170 mM, glicerol a 5%, pH 8,0, e o fluxo foi coletado como produto purificado e depois lavado com TrisHCl 20 mM, NaCl 1000 mM, Glicerol a 5%, pH 8,0, para remover impurezas e agregados. As proteínas de fusão purificadas foram analisadas por SDS-PAGE. Os resultados mostram que todas as proteínas de fusão sdAb-CD mostraram alta pureza após a purificação (figura 7A).

[00241] Proteínas de fusão sem marcador HIS

[00242] O sedimento celular foi ressuspenso em um tampão composto de 20 mM Tris-HCl e NaCl 150 mM em glicerol a 5% a pH 8,0 e homogeneizado por homogeneizador (APV2000) duas vezes a 850-950 bar por menos de 10 minutos. O homogenato resultante foi clarificado por centrifugação a 22000 xg durante 60 minutos a 4°C e filtrado. O filtrado foi purificado pela coluna de afinidade rProteinA (Repligen) seguido por um trocador de íons de coluna de

troca iônica Q sepharose (GE). O sistema de tampão para a coluna de afinidade rProteinA compreendeu 5% de glicerol, Tris-HCL 20 mM e 150 mM NaCl a pH 8,0 (para ligação e lavagem) e então foi eluído com glicina 50 mM, glicerol a 5%, tampão pH 3,0, após a eluição o produto foi neutralizado com Tris-HCl 1 M, pH 9,0 na proporção de 1 a 25. O tampão para cromatografia em coluna de troca iônica compreendeu 5% de glicerol, Tris-HCl 20 mM e NaCl 150 mM a pH 8,0. O produto purificado foi então filtrado pelo sistema TFF de 5 kDa (tamanho do poro) para concentrar o produto (filtração por fluxo tangencial) (Merck Millipore) e o tampão foi trocado pelo filtro Amicon de 10 kDa (Merck Millipore). (Figura 7B).

Exemplo 8. Análise por cromatografia de exclusão por tamanho das proteínas de fusão sdAb-CD

[00243] Para examinar a pureza de cada proteína de fusão, foi realizada cromatografia SEC-HPLC utilizando a resina de coluna BioSep SEC-s2000 (Phenomenex) ou Superdex 200 Increase (GE Healthcare) 10/300. As amostras da proteína produzida como acima foram primeiro diluídas para 1 ou 2 micrograma/mL em PBS contendo glicerol a 5%. As amostras foram filtradas usando um filtro de seringa de 0,2 pm (PureTech) e colocadas em uma inserção de PP (Thermo) para análise por SEC-HPLC. A fase móvel do BioSep SEC-s2000 foi fosfato de sódio 0,1 M com cloreto de sódio 0,3 M, pH 7,0. A fase móvel do Superdex 200 Increase foi de 5% de glicerol em PBS. A taxa de fluxo para qualquer coluna foi de 0,5 mL/min. A temperatura da coluna foi ajustada em 25 ± 2°C e a temperatura do amostrador automático foi ajustada em 10 ± 2°C. As proteínas foram detectadas por absorvância

em UV280. Os resultados mostraram que a pureza das proteínas de fusão sdAb-CD anti-VEGFR2 3VGR19-CD-H, 4VGR17-CD-H e 4VGR38-CD-H foi de cerca de 71%, cerca de 74% e cerca de 71%, respectivamente (figura 4A). A pureza para as proteínas de fusão anti-EGFR sdAb-CD VHH122-CD-H e 7D12-CD-H foi de cerca de 83% e cerca de 87%, respectivamente (figura 4A). Para 7D12-CDoem3-H e 7D12-CDoem3, a pureza foi de cerca de 88% e cerca de 93%, respectivamente (figura 4A). Após a otimização do processo de purificação, a pureza pode atingir cerca de 95% (figura 4B).

Exemplo 9. Atividade da citosina desaminase das proteínas de fusão sdAb-CD

[00244] Para examinar a atividade da citosina desaminase das proteínas de fusão CD, as proteínas de fusão sdAb-CD foram preparadas como acima, misturados em série diluentes das amostras de proteínas de fusão com 5-FC 20 mM em tampão compreendendo 0,25% de BSA e 0,05% de Tween 20, e as misturas foram incubadas a 37°C por 90 minutos. As reações foram então interrompidas com ácido tricloroacético a 10% e as misturas foram centrifugadas a 4°C para coleta do sobrenadante. A presença de 5-FC e 5-FU foi detectada por absorvância a 290 nm e 255 nm, respectivamente.

[00245] Os resultados demonstram que as proteínas de fusão sdAb-CD testadas visando o VEGFR2 converteram 5-FC em 5-FU (figura 5A). Resultados semelhantes foram obtidos para proteínas de fusão sdAb-CD visando EGFR, HER2, HER3 ou CEA (figura 5A e figura 5B).

Exemplo 10. Afinidade de ligação ao antígeno das proteínas de fusão sdAb-CD

[00246] A ligação entre o VEGFR2 humano e as proteínas de fusão sdAb-CD revelada no presente documento foi testada por ELISA. Para o ensaio de ligação ao VEGFR2, o anticorpo de revestimento VEGFR2-Fc Humano (Sino Biological) foi diluído até 1 micrograma/mL em tampão de revestimento ($NaHCO_3$ 100 mM + Na_2HCO_3 32 mM). O bloqueio foi realizado incubando com tampão de bloqueio (BSA a 0,25%, Tween-20 a 0,05%, NaN3 a 0,05%, EDN 1 mM) por 2 horas. As amostras de proteína de fusão testadas foram preparadas em tampão de bloqueio e adicionadas aos poços para ligação. O anti-His-HRP de coelho (abeam) foi diluído 5.000 vezes em um tampão compreendendo 0,25% de BSA e 0,05% de Tween 20 para detecção.

[00247] Para o ensaio de ligação ao EGFR, as placas ELISA foram revestidas com hEGFR-Fc (Sino Biological) com concentração de 1 micrograma/mL em tampão de revestimento. O bloqueio foi realizado incubando com tampão de bloqueio (BSA a 0,25%, Tween-20 a 0,05%, NaN_3 a 0,05%, 1 mM EDTA) por 2 horas. Após o bloqueio, as amostras foram diluídas em série em tampão de bloqueio e adicionadas aos poços para ligação 1 hora. Finalmente, os anticorpos secundários (coelho anti-HIS-HRP) foram diluídos em tampão compreendendo 0,25% de BSA e 0,05% de Tween 20 para detecção.

[00248] Para os ensaios de ligação de HER2, HER3 e CEA, o anticorpo de revestimento para cada ensaio foi ErbB2/Her2-Fc humano (Aero biosystem), ErbB3/Her3-Fc humano (Aero biosystem) humano e CEACAM5-Fc humano (novoproteína), respectivamente.

[00249] Os resultados mostraram que 3VGR19-CD-H, 4-VGR17-CD-H e 4VGR38-CD-H se ligam a VEGFR2; VHH122CD-H e 7D12-CD-H se ligam a EGFR; 5F7-CDoem3-H, 47D5-CDoem3-H e 2D3-CDoem3-H se ligam a HER2, NbCEA5-CDoem3-H e AntiCEA-CDoem3-H se ligam a CEACAM5; e BCD090-M2-CDoem3-H se liga a HER3 (figura 6 A e figura 6B).

Exemplo 11. Ensaio citotóxico com base em células para proteínas de fusão sdAb-CD

[00250] Protocolo A:

[00251] A citotoxicidade de várias proteínas de fusão sdAb-CD anti-EGFR combinou com 5-FC foi testada no MDA-MB-231 (carcinoma da mama humano) e A431 linhagens de célula cancerígena expressando EGFR A431 (carcinoma epidermoide humano) As células foram primeiro semeadas a 30.000 células/poço em placas de 96 poços e incubadas a 37°C durante a noite em meio de crescimento (DMEM (Gibco) mais 10% de FBS). Após 16-18 horas de incubação, os poços foram lavados uma vez com PBS. Foram adicionados 100 microlitros de proteína de fusão a 100 micrograma/mL a cada poço e incubou-se durante 1 hora a 37°C. Após lavagem com PBS para remover o excesso de proteína de fusão, 100 microlitros do 5-FC ou 5-FU nas concentrações indicadas foram adicionados aos respectivos poços durante 72 horas de incubação. Por último, foram adicionados 10 microlitros/poço do reagente de proliferação celular WST-1 (Roche) e as células foram incubadas a 37°C por 4 horas. A sobrevivência celular foi medida usando um leitor EFISA na absorvância OD450 (WST-1) e OD690 (comprimento de onda de referência). Os resultados demonstram que a combinação de cada proteína de fusão sdAb-CD testada com 5-FC diminuiu a

sobrevivência de células cancerígenas nas linhas celulares MDA-MB-231 e A431 (figura 9A e figura 9B).

[00252] Protocolo B:

[00253] Em ensaios alternativos, a citotoxicidade das proteínas de fusão anti-EGFR sdAb-CD da revelação combinada com 5-FC foi testada nas linhas celulares de câncer A431, Bx-PC3, Cal-27 e FaDu. Uma proteína CD com um marcador His de terminal C (CDoem3-H) foi usada como controle negativo de proteína (NP). Primeiro, as células foram ressuspensas com 4 mL de meio de cultura contendo NP 2 mM ou sdAb-CD e incubadas a 37°C por 1 hora. Cada linhagem celular utilizou o meio de crescimento sugerido por ATCC: A431: CRL-1555™; FaDu: HTB-43™; Cal 27: CRL-2095™; BxPC-3: CRL-1687™. As células foram então lavadas três vezes com PBS e resemeadas a 30.000 células/poço em uma placa de 96 poços. 5-FC nas concentrações indicadas foi adicionado aos poços e incubado a 37°C por 72 horas. Após a incubação, foram adicionados 10 microlitros do reagente de proliferação celular WST-1 e as misturas foram incubadas a 37°C por 3 horas. A sobrevivência celular foi medida usando um leitor ELISA em OD450 e OD690. Os resultados indicam que as proteínas de fusão anti-EGFR sdAb-CD diminuíram a taxa de sobrevivência para todas as linhas celulares de câncer testadas (figura 10A e figura 10B).

Exemplo 12. Teste de proteínas sdAb-CD no modelo xenoenxerto A431

[00254] Os efeitos terapêuticos das proteínas de fusão 7D12-CDoem3 ou 7D12-CDoem3-H foram avaliados com um modelo de xenoenxerto A431 em camundongos machos NOD-SCID (LASCo). Foram injetadas $2,5x10^6$ células tumorais A431 por

via subcutânea no flanco direito de camundongos pesados entre 20-27 g. Depois que o tamanho dos tumores atingiu 200-300 mm^3 (aproximadamente 10 dias após o transplante do tumor), os camundongos foram aleatoriamente designados para diferentes grupos de tratamento (n = 6). As quantidades indicadas de veículo (PBS) 5-FU (intraperitonealmente), 5-FC (intraperitonealmente) e proteínas de fusão sdAb-CD (intravenosa) foram administradas duas vezes por semana durante 4 semanas. A massa sólida dos tumores foi medida e a significância da diferença no volume do tumor foi avaliada pelo teste t de Student.

[00255] A administração intravenosa de 7Dl2-CDoem3-H ou 7Dl2-CDoem3 em 20 mg/kg ou 40 mg/kg com injeção intraperitoneal de 5-FC na dose de 500 mg/kg resultou em uma redução significativa no crescimento de tumores A431, como mostrado pelas reduções no volume e no peso do tumor em comparação com o grupo tratado com veículo após o transplante de células tumorais ($p < 0,01$) (figura 11A e figura 11B). Isto confirma que a coadministração de 7Dl2-CDoem3-H ou 7Dl2-CDoem3 com 5-FC pode ter um efeito inibitório no crescimento de células cancerígenas A431 *in vivo*.

Exemplo 13. Mapeamento de epítopos de células T

[00256] O mapeamento do epítopo das células T EpiScreen™ de 91 peptídeos resultou em respostas positivas das células T contra seis peptídeos compreendendo seis epítopos. Utilizando o iTope™, nove potenciais sequências de ligação restritas a HLA-DR foram identificadas nos peptídeos que induziram respostas positivas à proliferação de células T.

[00257] Em resumo, seis epítopos de células T foram identificados na sequência 7D12-CDoem3, os epítopos 1-3 localizados na região estrutural de 7D12 sdAb e o epítopo 4-6 localizado na região CD.

Epítopo	Epítopo restrito a HLA-DR	SEQ IDNÜ
Epítopo 1	SVQTGGSLRL	63
Epítopo 2	LKPEDTAN	64
Epítopo 3	IYYCAAAAGS	65
Epítopo 4	YTTLSPCDM	66
Epítopo 5	MCTGAIIMY	67
Epítopo 6	VVVVDDERCKK	68

Exemplo 14. Variante de epítopo único de proteínas de fusão sdAb-CD

[00258] As variantes individuais de epítopo único de 7D12-CDoem3-H foram projetadas para avaliar se essas variantes podem eliminar a imunogenicidade, mantendo sua estrutura, solubilidade, atividade da CDase e atividade de ligação ao antígeno.

[00259] Os plasmídeos de expressão de 43 variantes de epítopo único foram gerados por sobreposição de PCR. Essas variantes da proteína de fusão foram geradas e a atividade da CD, a atividade de ligação ao EGFR e o perfil de expressão da mesma foram acessados. Os resultados estão resumidos na figura 12.

[00260] Os dados indicaram que todas as substituições do domínio de ligação ao EGFR (TC3-001 ~ TC3-027) não tiveram efeito óbvio na capacidade de ligação ao EGFR. Todas as oito variantes com os epítopos 4 e 5 modificados (TC3-028 ~ TC3-035) perderam sua atividade

CDase. As variantes com o epítopo modificado 6 (TC3-036-TC3-043) foram menos afetadas.

[00261] Com base no título da expressão, na atividade biológica e na similaridade da sequência com a linha germinativa humana (domínio de ligação ao EGFR), as seguintes variantes foram selecionadas para o design de múltiplas mutações (numeração em relação à SEQ ID NO: 17):

a. Epítopo 1: S12V, V13A, T15V, G16D e S18D

b. Epítopo 2: K88R, P89A, I94V, K88D, K88T

c. Epítopo 3: 194R, I94Q

d. Epítopo 4: Y224H

e Epítopo 6: V268A, V268T, V269T

Exemplo 15. Variante de epítopo único de proteínas de fusão sdAb-CD

[00262] Os plasmídeos de expressão de 43 variantes de multi-mutação de TC3 foram gerados por sobreposição de PCR. Essas variantes da proteína de fusão foram geradas e a atividade da CDase, a atividade de ligação ao EGFR e seu perfil de expressão foram acessados. Os resultados estão resumidos na figura 13A e figura 13B.

[00263] Com base no título da expressão, na atividade biológica, nas características psicológicas e na cobertura para eliminar os epítopos das células T, cinco variantes múltiplas candidatas foram ainda selecionadas para avaliar seu potencial imunogênico.

Exemplo 16. Análise de imunogenicidade

[00264] Cinco variantes de 7D12-CDoem3 foram avaliadas quanto ao seu potencial imunogênico, utilizando ensaios de células T EpiScreen™ ao longo do tempo. Culturas em volume foram estabelecidas usando PBMC depletadas por

CD8+, e a proliferação de células T CD4+ foi medida em vários momentos após a adição das amostras por incorporação de [3H]-timidina. A secreção de IL-2 também foi medida pelo EFISpot após oito dias. O TC4 (amostra 1) e outras 4 candidatas a proteínas de fusão foram testados.

Amostra	Denominação da proteína de fusão	SEQ ID NO
Amostra 1	TC4-WT (7DI2-CDoem3)	19
Amostra 2	TC4 44 (SI2V, T15\1; K88R, P89A, 194\1; V268A)	182
Amostra 3	TC4 50 (V13A, K88T, I94R, V268A)	183
Amostra 4	TC4 51 (GI6D, K88T, I94R, V268A)	184
Amostra 5	TC4 87 (SI2V, T15\1; K88R, P89A, 194\1; V268A, V269T)	185

[00265] **Ensaios de proliferação de células T no curso temporal EpiScreen™**

[00266] Uma coorte de 52 doadores foi selecionada para melhor representar o número e a frequência dos alotipos HFA-DR e HFA-DQ expressos nas populações dos países Europeus/América do Norte. As PBMCs de cada doador foram ressuspensas em AIM-V® a 4-6x10^6 PBMC/mL. A concentração final da amostra da proteína recombinante testada foi de 0,3 mM. As culturas foram incubadas por um total de 8 dias. Nos dias 5, 6, 7 e 8, as células em cada poço foram pulsadas com 0,75 µCi [3H]-timidina (Perkin Elmer®, Beaconsfield, Reino Unido) em meio de cultura 100 µL AIM-V® e incubadas por mais 18 horas antes da colheita em esteiras de filtro (Perkin Elmer®, Beaconsfield, Reino Unido) usando um coletor de células TomTec Mach III. As contagens por minuto (cpm) para cada poço foram determinadas por contagem de cintilação em um contador de cintilação líquida 1450 Microbeta Wallac Trilux (Perkin

Elmer®, Beaconsfield, Reino Unido) em paralux, com baixa contagem de fundo.

[00267] ***Ensaios EpiScreen™ IL-2 ELISpot***

[00268] PBMCs da mesma coorte de doadores foram utilizados para o ensaio IL-2 ELISpot. As placas ELISpot (Millipore, Watford, Reino Unido) foram pré-umedecidas e revestidas durante a noite com anticorpo de captura de IL-2 (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). A densidade celular de cada doador foi ajustada para 4-6 x 10^6 PBC/mL em meio de cultura AIM-V® e 100 µL de células foram adicionados a cada poço. Cinquenta microlitros de amostras e controles foram adicionados aos poços apropriados. Após um período de incubação de 8 dias, as placas ELISpot foram desenvolvidas de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems). Resumidamente, as placas foram lavadas antes da adição de anticorpo de detecção biotinilado (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). Após incubação a 37°C durante 1,5 horas, as placas foram lavadas em PBS (x3) e filtradas estreptavidina-AP (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) foi adicionada por 1 hora (incubação à temperatura ambiente). A estreptavidina-AP foi descartada e as placas foram lavadas em PBS (x3). Cem microlitros de substrato BCIP/NBT (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) foram adicionados a cada poço e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. O desenvolvimento do ponto foi interrompido lavando os poços e as costas dos poços três vezes com dH2O. As placas secas foram escaneadas em um Immunoscan® Analyzer e as manchas por poço (spw) foram determinadas usando o software Immunoscan® Versão 5.

[00269] Para ensaios de proliferação e ensaios EL-IL-2 de IL-2, um limiar empírico de um SI igual ou superior a 1,9 (SI> 1,90) foi previamente estabelecido, pelo qual as amostras que induzem respostas acima desse limiar são consideradas positivas. Para a proliferação (n = 3 por ponto no tempo) e ELISpot (n = 6), as respostas positivas foram definidas por limiares estatísticos e empíricos da seguinte forma:

[00270] 1. Significância *(p* <0,05) da resposta comparando cpm ou spw de poços de teste contra poços de controle médios usando o teste t de Student de duas amostras não emparelhado.

[00271] 2. SI≥ 1,90, em que SI = média dos poços de teste (cpm ou spw)/linha de base (cpm ou spw).

[00272] A figura 14 mostra o resumo da proliferação saudável de células T do doador e respostas IL-2 ELISpot. Respostas positivas de células T para proliferação (SI≥ 1,90, p significante <0,05) durante todo o período de dias 5-8 ("P") e IL-2 (SI≥ 1,90, significante p <0,05) ELISpot ("E") são indicados. A frequência de respostas positivas para os ensaios de proliferação e IL-2 ELISpot é mostrada como uma porcentagem na parte inferior das colunas. A correlação é expressa como a porcentagem de respostas de proliferação também positivas no ensaio ELISpot.

[00273] Devido à baixa frequência de respostas positivas no ensaio IL-2 ELISpot, classifique as amostras com base apenas nas respostas de proliferação. Uma alta frequência de respostas positivas (SI≥ 1,90, *p* <0,05) foi induzida pela amostra 4, com 25% da coorte doadora

respondendo. As amostras 1, 3 e 5 induziram respostas positivas entre 12% e 15% da coorte de doadores e 8% dos doadores responderam positivamente à amostra 2. A amostra 2 produziu o menor risco de imunogenicidade clínica.

Exemplo 17. Análise funcional de sdAb-CD desimunizado

[00274] A atividade do CD e a atividade de ligação ao EGFR das variantes de TC4 desimunizadas foram analisadas e são mostradas na figura 15.

[00275] A atividade da CD foi avaliada pelo método descrito no Exemplo 8.

[00276] A afinidade de ligação entre proteínas relacionadas ao TC4 e EGFR-Fc foi medida por Ressonância Plasmo de Superfície (SPR). O ensaio SPR foi realizado por Bia core T100 (GE Healthcare). O anticorpo IgG anti-humano (Fc) a 25 micrograma/mL foi diluído em tampão de imobilização (NaOAc 10 mM, pH 5,0). O anticorpo foi imobilizado em um chip CM5 (Chip de sensor Série S CM5, GE; Cat. 29l04988) via química padrão de acoplamento de amina de acordo com o protocolo de fabricação. O procedimento deve resultar em um nível de imobilização de ~9000 RU. A fase móvel foi PBST e a temperatura nas células de fluxo foi mantida a 25°C. Após a imobilização, a solução de ligante (proteína EGFR-Fc humana, 2 micrograma/mL na fase móvel) foi injetada no sistema com tempo de contato 120 s e taxa de fluxo 10 µL/min. Em seguida, os mutantes TC4-wt ou TC4-, que foram diluídos para 0,74, 2,22, 6,67, 20 e 60 nM em PBST, foram injetados em sistemas de baixa concentração a alta concentração. A condição para injeção do analito era o tempo de contato de 120 segundos para cada concentração e

dissociava as amostras por 600 segundos na etapa final. A análise foi realizada com o software de avaliação Biacore T100. O resultado analítico do analito de cinética de ciclo único para cada amostra foi ajustado por uma reação em dois estados para determinar o valor de KD. O critério de resultado foi que a resposta máxima (R_{max}) deveria estar na faixa de 50-250 RU.

[00277] Os dados sugeriram que a capacidade de ligação ao EGFR e a atividade de CD das variantes TC4 TC4-44, 50, 51 e 87 eram semelhantes em comparação com o tipo selvagem TC4 (figura 15).

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão compreendendo a fórmula I ou fórmula II, em que:

a fórmula I é $N-(L)_n-C$; e

a fórmula II é $C-(L)_n-N$;

em que N é um anticorpo de domínio único (sdAb) ou uma variante funcional do mesmo, L é um ligante peptídico, n = 0-50 e C é uma proteína da citosina desaminase (CD) ou uma variante funcional do mesmo.

2. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, em que n = 0.

3. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, em que n = 1.

4. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, em que n = 2.

5. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a proteína de fusão consiste essencialmente na fórmula I ou na fórmula II.

6. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a proteína de fusão consiste na fórmula I ou na fórmula II.

7. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o sdAb ou sua variante funcional se liga a um alvo, em que o alvo é opcionalmente selecionado a partir do grupo que consiste em uma molécula de membrana celular, uma molécula segregada e uma molécula intracelular.

8. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 7, em que o alvo é um antígeno associado ao tumor ou um antígeno específico do tumor.

9. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 7 ou reivindicação 8, em que o alvo é selecionado do grupo que consiste em EGFR, 5T4, A33, AFP, beta-catenina, BRCA1, BRCA2, C242, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23, CD30, CD3, CD37, CD40, CD44, CD5, CD51, CD52, CD56, CD64, CD74, CD80, CDCP1, c-KIT, COX-2, cMET, CSF1R, CTEA-4, EGF2, ErbB2, ErbB3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FET3, HER2, HER3, HIF-Ia, HLA-DR, IGF-IR, mTOR, NPC-1C, P53, PDGFRα, PDGFRβ, PFGF, PSA, RGMa, RoN, TNF, TP53, TPD52, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, CA-IX, αvβ3, α5β1, FAP, glicoproteína 75, TAG-72, MUC16, NR-EU-13, SEAMF7, EGP40, BAFF, PRF-3, antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno de membrana específico para próstata, MART-l, gp100, antígenos de câncer-testículo (CT) (por exemplo, NY-ESO-l, MAGE-A3, MAGE-A1), hTERT, Mesotelina, MCC, Mum-l, ERBB2IP, EpCAM, TfR, integrina aa6bb4, HGFR, PTP-EAR, CD147, CDCP1, CEACAM6, JAM1, integrina aa3bb1 , integrina aavbb3, PD-E1, AX, CDH6, DLL3, EDNRB, EFNA4, NEPP3, EPHA2, FOLR1, LewisY, GPNMB, GUCY2C, HAVCR1, Integrina α, LYPD3, MUC1, NECTIN4, NOTCH3, PTK7, SLC34A2, SLC34A4, SLITRK6, STEAP1, TACSTD2, TPBG, TIM-1, GD2 e receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

10. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, em que o alvo é selecionado do grupo que consiste em EGFR, c-KIT, cMET, HER2, HER3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IGF-IR, P53, PDGFRα, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, CA-IX, αvβ3, α5β1, MUC16, antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno de membrana específico da próstata, antígenos de testículos-câncer (CT) (por exemplo, NY-ESO-l, MAGE-A3, MAGE-A1), mesotelina, EpCAM, integrina α6β4,

CEACAM6, integrina α3β1, integrina αvβ3, PD-L1, AXL, CDH6, DLL3, EDNRB, EFNA4, NEPP3, EPHA2, FOLR1, LewisY, GPNMB, GUCY2C, HAVCR1, Integrina α, LYPD3, MUC1, NECTIN4, NOTCH3, PTK7, SLC34A2, SLC39A6, SLC44A4, SLITRK6, STEAP1, TACSTD2, TPBG, TIM-1, GD2 e receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

11. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, em que o alvo é VEGFR2, EGFR, CEA, HER2 ou HER3.

12. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 11, em que o alvo é VEGFR2.

13. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 11, em que o alvo é EGFR.

14. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 11 ou reivindicação 12, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende uma região determinante de complementaridade 1 (CDR1) selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28, 31 e 34; uma CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29, 32 e 35; e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30, 33 e 36.

15. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 14, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (3VGR19).

16. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 14, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (4VGR17).

17. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 14, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (4VGR38).

18. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 11 ou reivindicação 13, em que o sdAb ou variante funcional do mesmo compreende um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 37 e 40, uma CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 38 e 41, e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 39 e 42.

19. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 18, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 (VHH122).

20. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 18, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 (7D12).

21. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 11, em que o sdAb ou sua variante de função compreende um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 199, 202 e 205; uma CDR2 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 200, 203 e 206; e uma CDR3 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 201, 204 e 207.

22. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 21, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 (2D3).

23. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 21, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 (5F7).

24. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 21, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 (47D5).

25. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 11, em que o sdAb ou sua variante de função compreende uma CDR1 da SEQ ID NOs: 208, uma CDR2 da SEQ ID NOs: 209 e uma CDR3 da SEQ ID NOs: 210.

26. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 25, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 (BCD090-M2).

27. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 11, em que o sdAb ou sua variante de função compreende um CDR1 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 211 e 214, uma CDR2 selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 212 e 215 e uma CDR3 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 213 e 216.

28. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 27, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 (ABS29544.1).

29. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 27, em que o sdAb ou sua variante funcional compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 (NbCEA5).

30. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1 ou qualquer uma das reivindicações 3-29, em que pelo menos um ligante peptídico compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 188.

31. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, em que a proteína CD ou sua variante funcional é (i) uma proteína CD bacteriana ou uma sua variante funcional ou (ii) um CD de levedura ou uma sua variante funcional.

32. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 31, em que a proteína CD ou sua variante funcional compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica, pelo menos 91% idêntica, pelo menos 92% idêntica, pelo menos 93% idêntica, pelo menos 94% idêntica, pelo menos 95% idêntica, pelo menos 96% idêntica, pelo menos 97% idêntica, pelo menos 98% idêntica, pelo menos 99% idêntica ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs : 21, 22, 186 e 187.

33. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 32, em que a proteína CD ou sua variante funcional compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21, 22, 186 e 187.

34. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 32, em que a proteína CD ou sua variante funcional consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 21, 22, 186 e 187.

35. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 31 ou reivindicação 32, em que a proteína CD ou sua variante funcional é uma variante funcional de uma sequência de aminoácidos inicial selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 21, 22, 186 e 187; em que, quando a sequência de aminoácidos inicial é SEQ ID NO: 21 ou SEQ ID NO: 22, a variante funcional compreende pelo menos uma mutação selecionada do grupo que consiste em Y84A, Y84H, T85D, T86E, M92N, M92A, M92K, M92Q, V128A, V128T, V129A, V129L, V129I, V129T, VI30A e V130T; e em que, quando a sequência de aminoácidos inicial é SEQ ID NO: 186 ou SEQ ID NO: 187, a variante funcional compreende pelo menos uma mutação selecionada do grupo que consiste em Y85A, Y85H, T86D, T87E, M93N, M93A, M93K, M93Q, V129A, V129T, V130A, V130L, V130I, V130T, V131A e V131T.

36. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que a proteína de fusão compreende um sdAb anti-VEGFR2 ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional da mesma.

37. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 36, em que a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em: (i) SEQ ID NO: 7, (ii) aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 7, (iii) SEQ ID NO: 9, (iv) aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 9, (v) SEQ ID NO: 11 e (vi) aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 11.

38. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 ou reivindicação 13, em que a proteína de fusão compreende um sdAb anti-EGFR ou uma

variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional do mesmo.

39. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 38, em que a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

(i) SEQ ID NO: 13,

(ii) aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 13,

(iii) SEQ ID NO: 15,

(iv) aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 15,

(v) SEQ ID NO: 17 e

(vi) SEQ ID NO: 19.

40. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a proteína de fusão compreende um sdAb anti-HER2 ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional do mesmo.

41. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 40, em que a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em:

(i) SEQ ID NO: 72,

(ii) aminoácidos 1-297 da SEQ ID NO: 72,

(iii) SEQ ID NO: 73,

(iv) aminoácidos 1-291 da SEQ ID NO: 73,

(v) SEQ ID NO: 74 e (vi) aminoácidos 1-292 da SEQ ID NO: 74.

42. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a proteína de fusão compreende um sdAb anti-HER3 ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional da mesma.

43. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 42, em que a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em: (i) SEQ ID NO: 76 e (ii) aminoácidos 1-300 da SEQ ID NO: 76.

44. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a proteína de fusão compreende um sdAb anti-CEA ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína CD ou uma variante funcional da mesma.

45. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 44, em que a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

(i) SEQ ID NO: 78,

(ii) aminoácidos 1-293 da SEQ ID NO: 78,

(iii) SEQ ID NO: 80 e

(iv) aminoácidos 1-296 da SEQ ID NO: 80.

46. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a proteína de fusão compreende pelo menos uma mutação desimunizadora em pelo menos um epítopo de célula T, em que o pelo menos um epítopo de célula T é selecionado do grupo que consiste no epítopo 1 (SEQ ID NO: 63), epítopo 2 (SEQ ID NO: 64), epítopo 3 (SEQ ID NO: 65), epítopo 4 (SEQ ID NO: 66), epítopo 5 (SEQ ID NO: 67) e epítopo 6 (SEQ ID NO: 68).

47. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína de fusão consiste essencialmente na sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 17, 19, 93-185 ou nos aminoácidos 1-297 de qualquer uma das SEQ ID NOs: 93-181.

48. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 47, em que a proteína de fusão consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 19, 182, 183, 184 e 185.

49. Composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de pelo menos uma proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações precedentes e pelo menos um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

50. Método para tratamento de câncer em um indivíduo em necessidade do mesmo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de pelo menos uma proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 1-48 ou a composição farmacêutica da reivindicação 49.

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma proteína de fusão ou a composição farmacêutica é administrada parentericamente.

52. Método, de acordo com a reivindicação 50 ou reivindicação 51, compreendendo ainda a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um substrato para a citosina-desaminase.

53. Método, de acordo com a reivindicação 52, em que o substrato compreende um pró-fármaco de 5-fluoruracila.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, em que o pró-fármaco de 5-fluoruracila é selecionado do grupo que consiste em 5-fluorcitosina (5-FC); Toca FC; análogos de 5-FC; e compostos fotoativáveis, sais ou ésteres dos mesmos.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, em que o pró-fármaco é 5-FC.

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50-55, em que o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de cólon, câncer de estômago, câncer de pâncreas, câncer de mama, carcinoma basocelular, doença de Bowen, câncer cervical, neoplasia escamosa da superfície ocular, melanoma carcinoma de células renais, câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de vesícula biliar, câncer de laringe, câncer de fígado, câncer de tireoide, câncer de glândula salivar, câncer de próstata, câncer colorretal, câncer de cabeça e pescoço, colangiocarcinoma, câncer de esôfago, câncer de osso, câncer endometrial, câncer de ovário, sarcoma de tecidos moles e carcinoma de células de Merkel.

57. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 56, em que o câncer é um tumor sólido.

58. Método, de acordo com a reivindicação 57, em que o tumor sólido é câncer de cólon, câncer colorretal, câncer de pâncreas ou câncer de cabeça e pescoço.

59. Molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 1-48, em que a molécula de ácido nucleico compreende opcionalmente uma sequência de ácido nucleico otimizada por códon.

60. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 59, em que a molécula de ácido nucleico consiste essencialmente em uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 195, 196, 197, e 198.

61. Vetor compreendendo a molécula de ácido nucleico da reivindicação 59 ou reivindicação 60.

62. Célula hospedeira que compreende o vetor da reivindicação 61.

63. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 62, em que a célula hospedeira é uma célula não mamífera.

64. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 63, em que a célula hospedeira é uma célula de levedura ou uma célula bacteriana.

65. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 64, em que a célula hospedeira é uma célula de *E. coli*, uma célula Archaebacterial ou uma célula Actinobacteriana.

66. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 65, em que a célula hospedeira é uma cepa de *E. coli* que fornece um ambiente citoplasmático para a formação de ligações dissulfeto.

67. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 66, em que a cepa de *E. coli* expressa constitutivamente uma cópia cromossômica de uma isomerase de ligação dissulfeto citosólica.

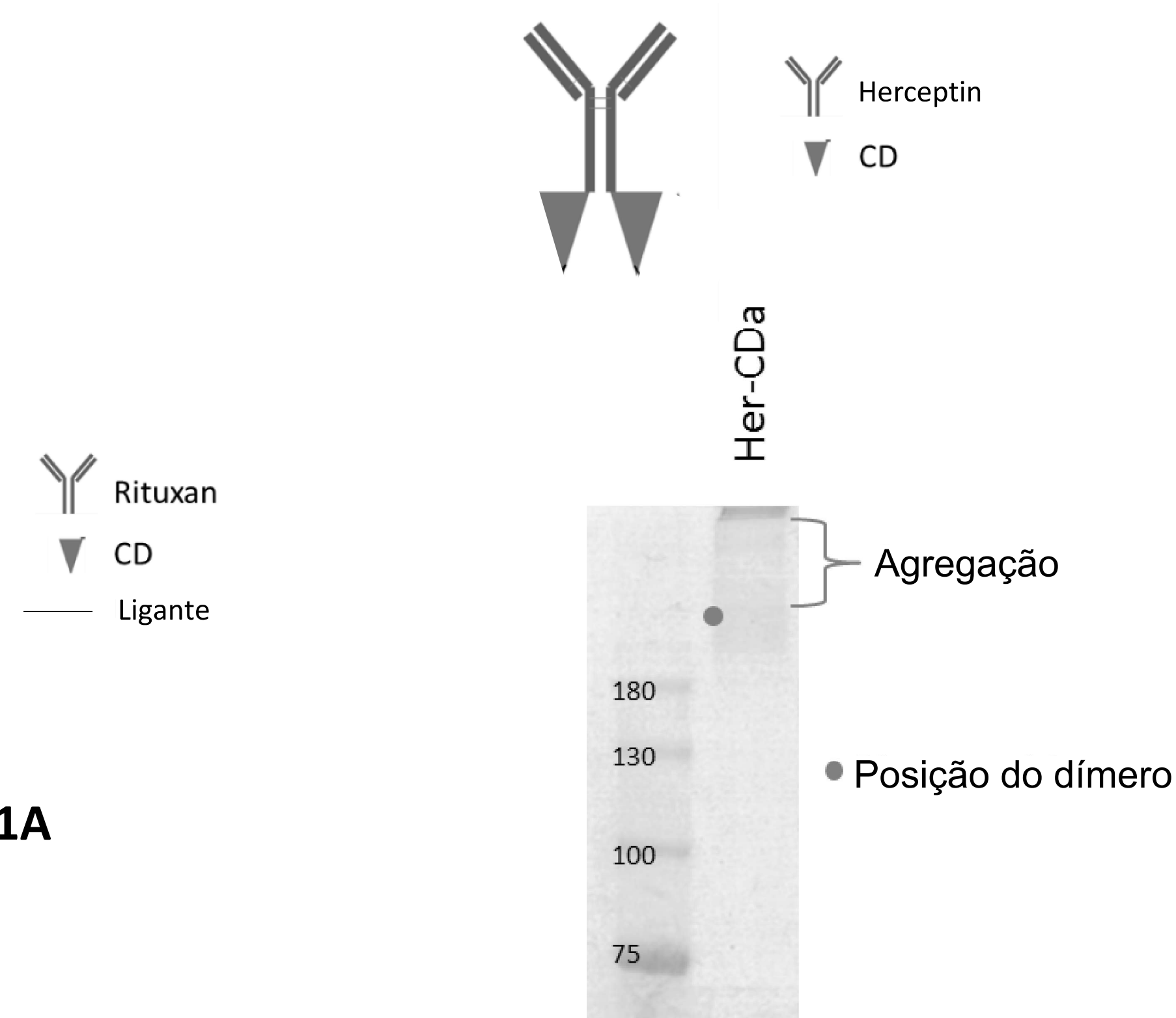
68. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 67, em que a isomerase da ligação dissulfeto citosólica é DsbC.

69. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 66, em que a cepa de *E. coli* é SHuffle® T7, Expressa SHuffle® T7, Expressa SHuffle®, Origami™ ou Rosetta-gami™.

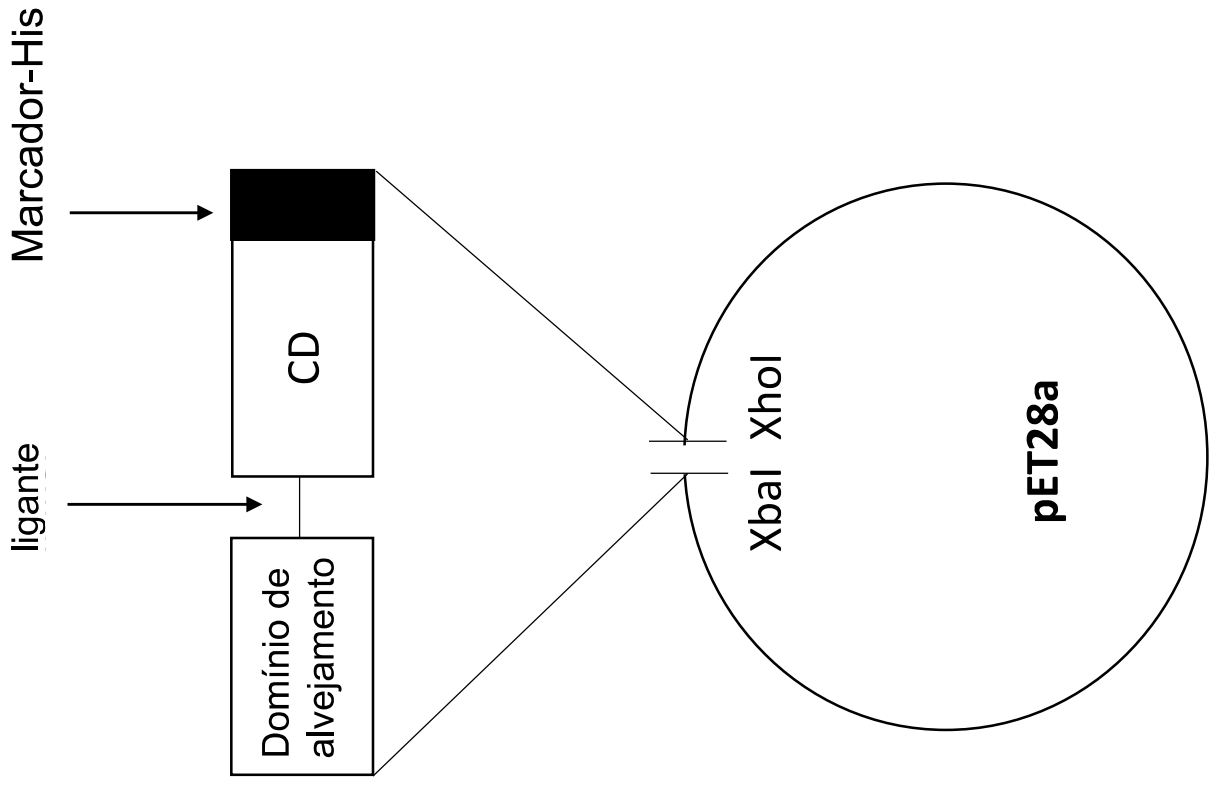
70. Método para produzir uma proteína de fusão compreendendo expressão do ácido nucleico de acordo com a reivindicação 59 ou reivindicação 60 em uma célula hospedeira.

71. Método, de acordo com a reivindicação 70, em que a célula hospedeira é manipulada para melhorar a atividade, produção citoplasmática e/ou estabilidade da proteína de fusão.

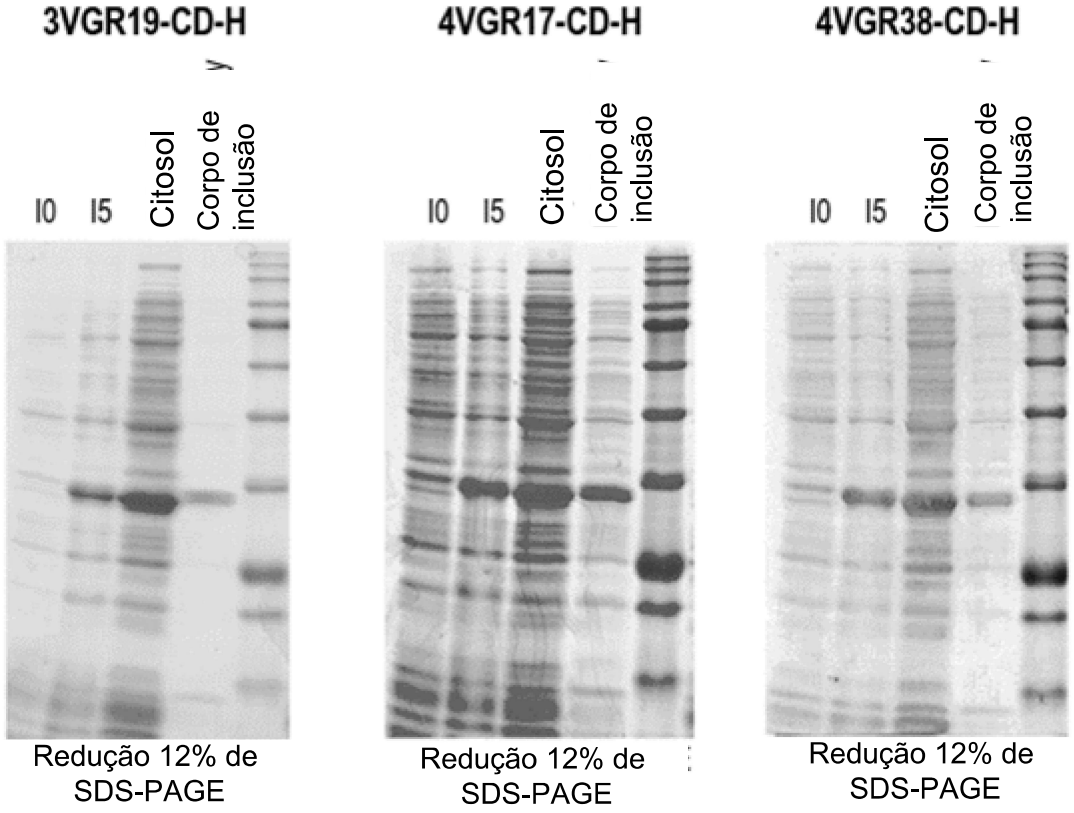
72. Método, de acordo com a reivindicação 71, em que o método produz uma proteína de fusão com ligações dissulfeto para as quais a atividade, produção citoplasmática e/ou estabilidade da proteína de fusão é aumentada em 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes ou 100 vezes em comparação com a proteína de fusão produzida por uma versão não projetada da mesma célula hospedeira.


Herceptin
CD
Her-CDa
Rituxan
CD
Ligante
Agregação
180
130
100
75
Posição do dímero

1A


Marcador-His
CD
ligante
Domínio de alvejamento
XbaI XhoI
pET28a

Tipo de domínio de Alvejamento	Denominação da proteína de fusão	SEQ ID NO	Sistema de expressão	Caracterização físico-química		5 litros de titulação do fermentador	atividade de CD	Atividade de ligação de antígeno
				Solubilidade/ titulação em escala pequena µg/mL	Pureza			
sdAb (VHH)	3VGR19-CD-H	7	expressão de SHuffle(R) T7	Solúvel / ~19	v	375 mg/L	v	v
	3VGR10-CD-H	86		Solúvel / ~ 6.2	v		v	v
	3VGR17-CD-H	87		Solúvel / ~ 10	v		v	v
	4VGR17-CD-H	9		Solúvel / ~19	v	405 mg/L	v	v
	4VGR38-CD-H	11		Solúvel / ~20	v		v	v
	DOM-16-39-CD-H	88		Solúvel / N/A	v		v	v
	VH122-CD-H	13		Solúvel / 9.2	v		v	v
	7D12-CD-H	15		Solúvel / 7.5	v	211 mg/L	v	v
	7D12-CDoem3-H	17		Solúvel / 8.1	v	259 mg/L	v	v
	7D12-CDoem3	19		Solúvel / 7.8	v	163 mg/L	v	v
	5F7-CDoem3-H	73		Solúvel / 39	v		v	v
	47D5-CDoem3-H	74		Solúvel / 4.5	v		v	v
	2D3-CDoem3-H	72		Solúvel / 38	v		v	v
	NbCEA5-CDoem3-H	80		Solúvel / 15.2	v		v	v
	Anti-CEA-CDoem3-H	78		Solúvel / 11.3	v		v	v
	BCD090-M2-CDoem3-H	76		Solúvel / 29	v		v	v
Fragmento de ligação de antígeno	GE10-CD-H	81	T7 express	Solúvel	Agregação, desagregação		v	Baixa
	GE11-CD-H	82		Solúvel	v		v	Sem atividade
	Inherbin1-CD-H	83		Solúvel	dímero ou multímero		v	Sem atividade
	Inherbin3-CD-H	84		Solúvel	Agregação, dímero ou multímero		v	Baixa
Proteína madura	Endo-CD	85		Não solúvel	N/D		v	N/D

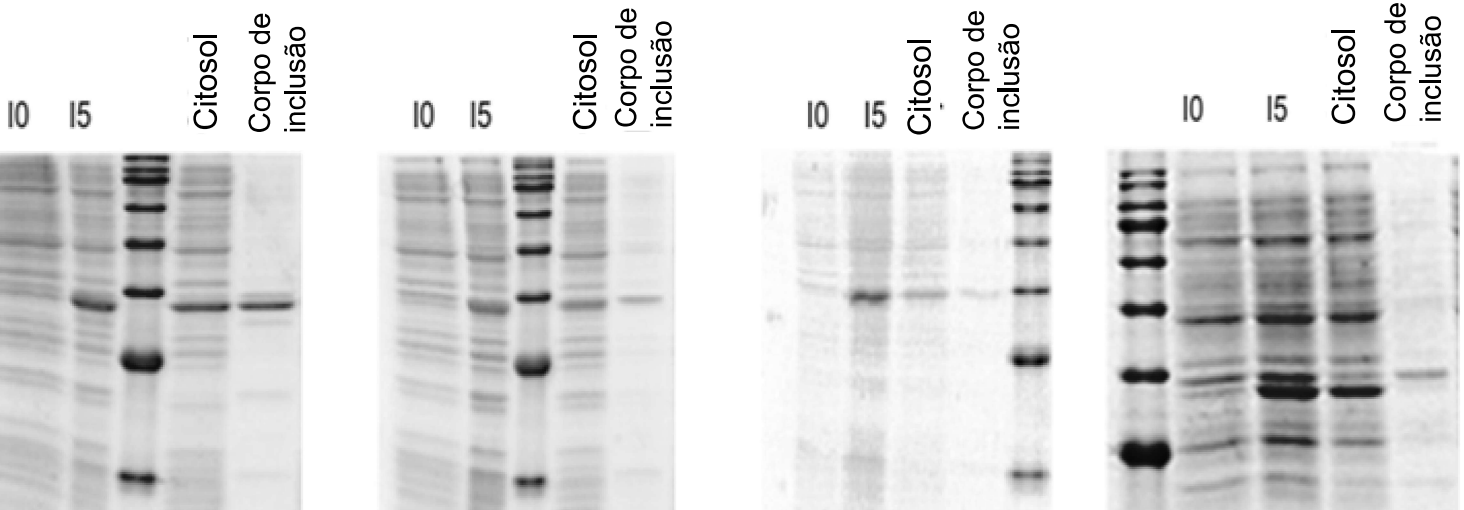


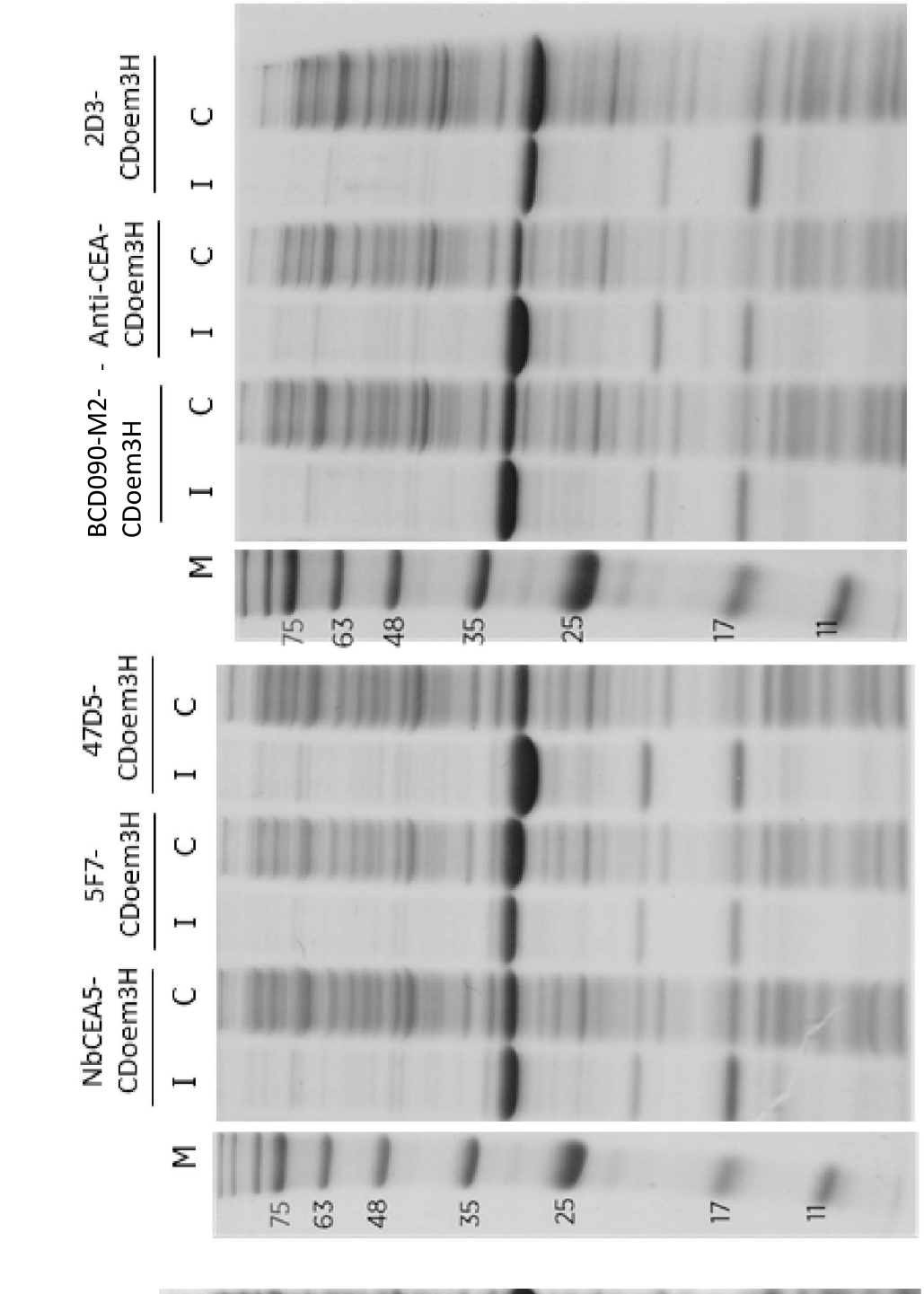
VHH122-CD-H (Redução 15% de SDS-PAGE)

7D12-CD-H (Redução 15% de SDS-PAGE)

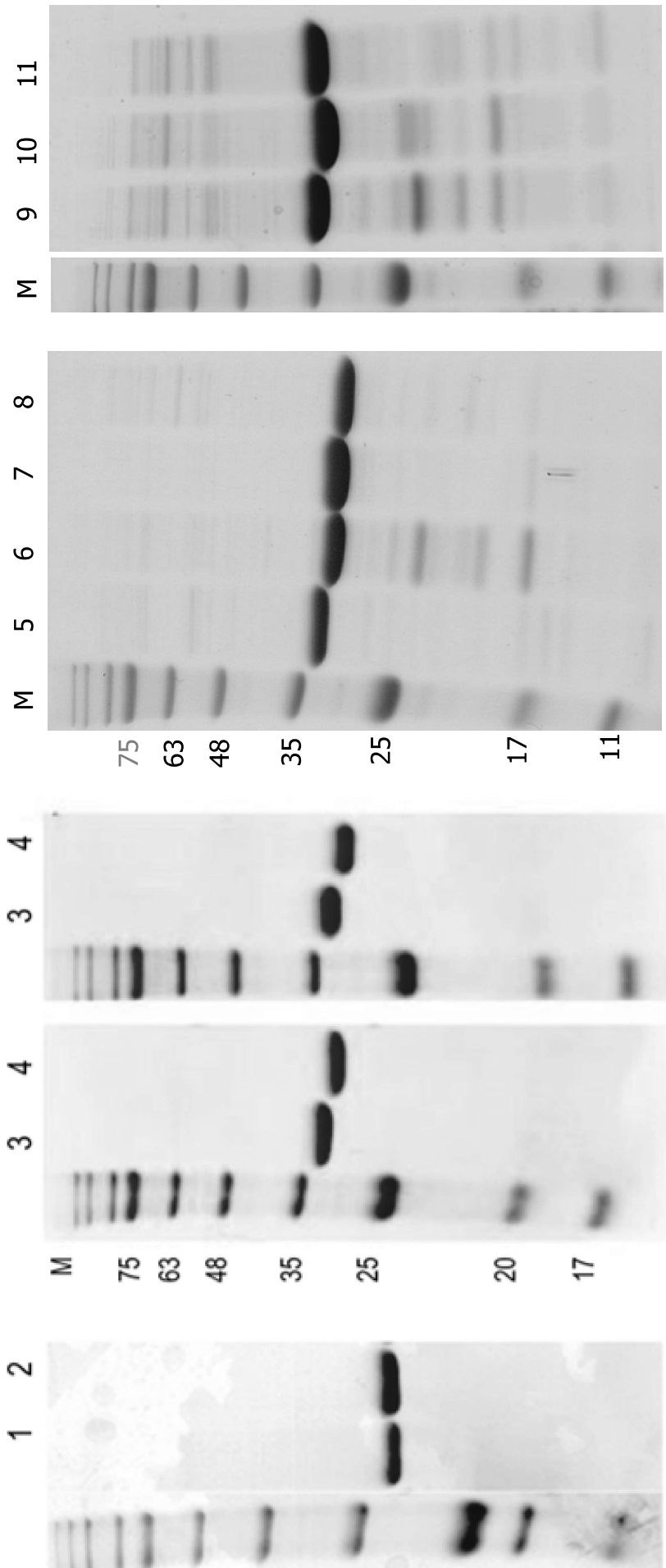
7D12-CDoem3-H (Redução 15% de SDS-PAGE)

7D12-CDOEM3 Redução 12% de SDS-PAGE

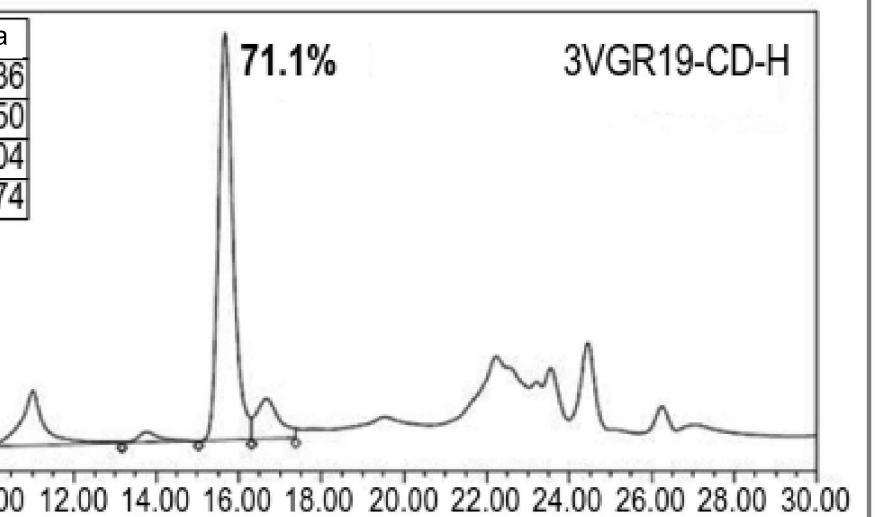


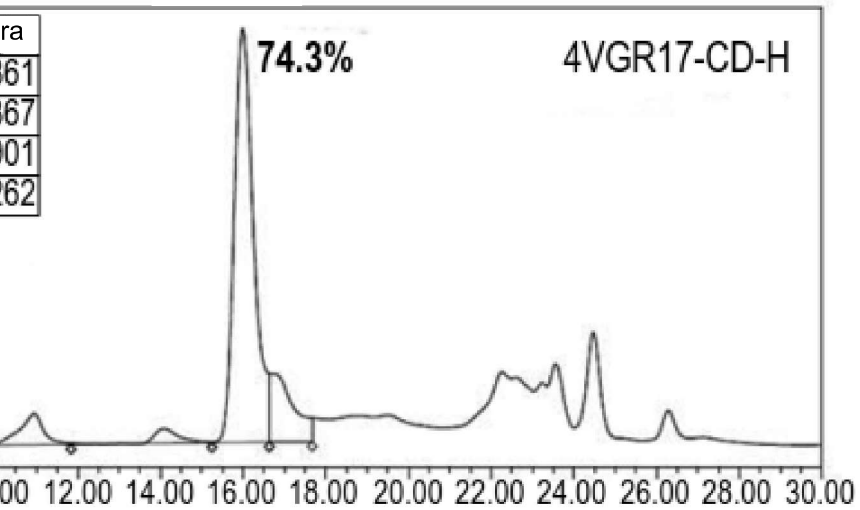


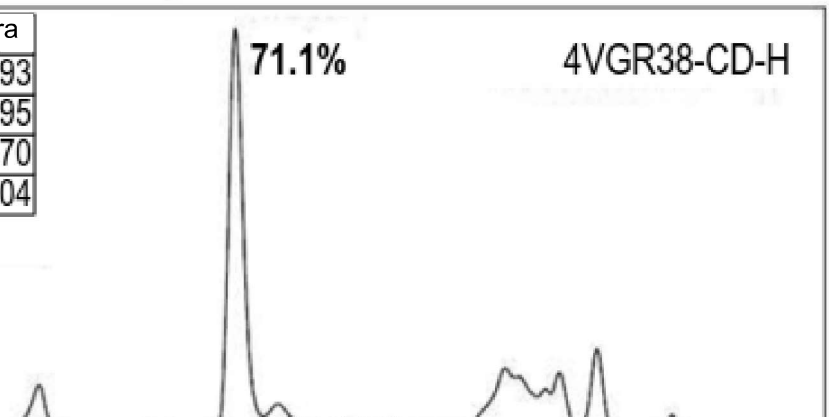
I: Corpo de inclusão
C: Citosol

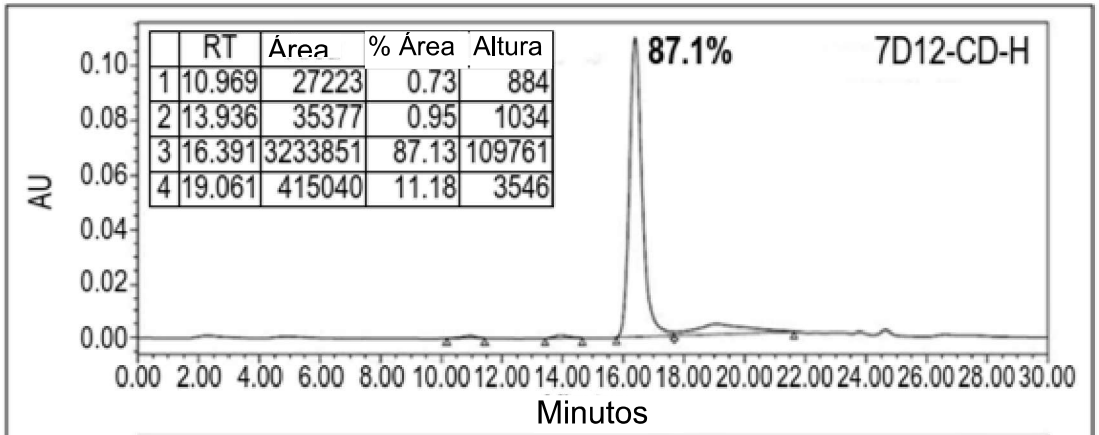


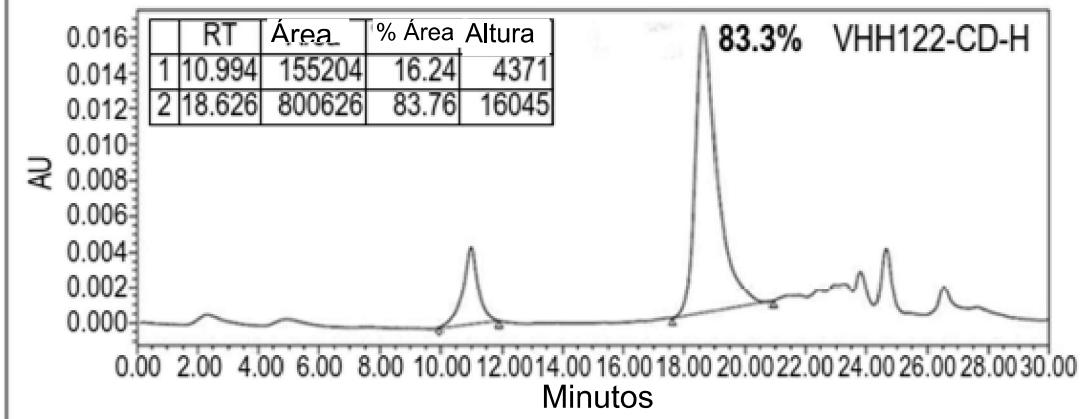
Amostra
L2-CD-H
2-CD-H
em3-H (TC3)
oem3 (TC4)
TC3
-CDoem3H

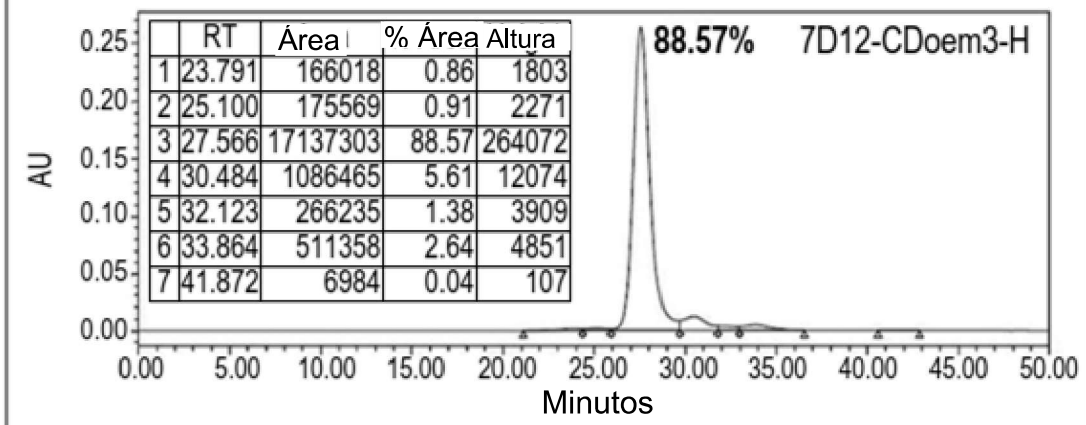

71.1%
3VGR19-CD-H
00 12.00 14.00 16.00 18.00 20.00 22.00 24.00 26.00 28.00 30.00
Minutos

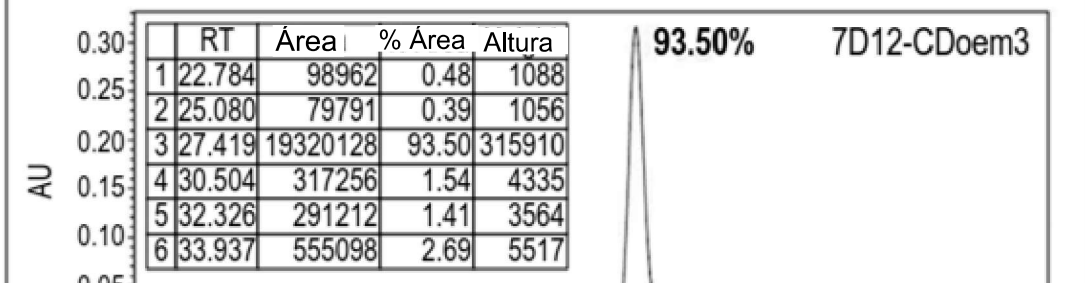

74.3%
4VGR17-CD-H
00 12.00 14.00 16.00 18.00 20.00 22.00 24.00 26.00 28.00 30.00

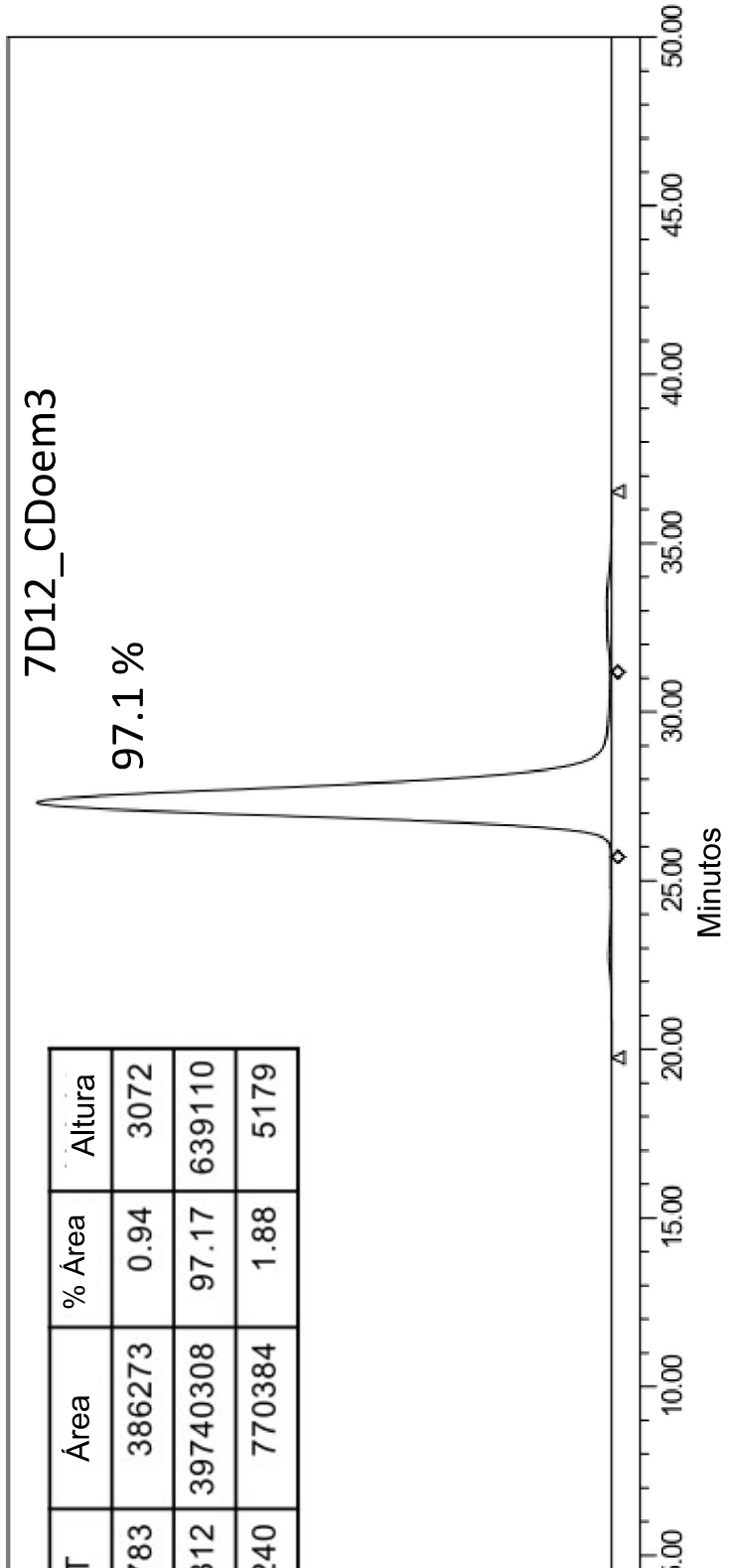

71.1%
4VGR38-CD-H


RT Área % Área Altura
1 10.969 27223 0.73 884
2 13.936 35377 0.95 1034
3 16.391 3233851 87.13 109761
4 19.061 415040 11.18 3546
87.1%
7D12-CD-H
AU
0.00 2.00 4.00 6.00 8.00 10.00 12.00 14.00 16.00 18.00 20.00 22.00 24.00 26.00 28.00 30.00
Minutos


RT Área % Área Altura
1 10.994 155204 16.24 4371
2 18.626 800626 83.76 16045
83.3%
VHH122-CD-H
AU
0.00 2.00 4.00 6.00 8.00 10.00 12.00 14.00 16.00 18.00 20.00 22.00 24.00 26.00 28.00 30.00
Minutos

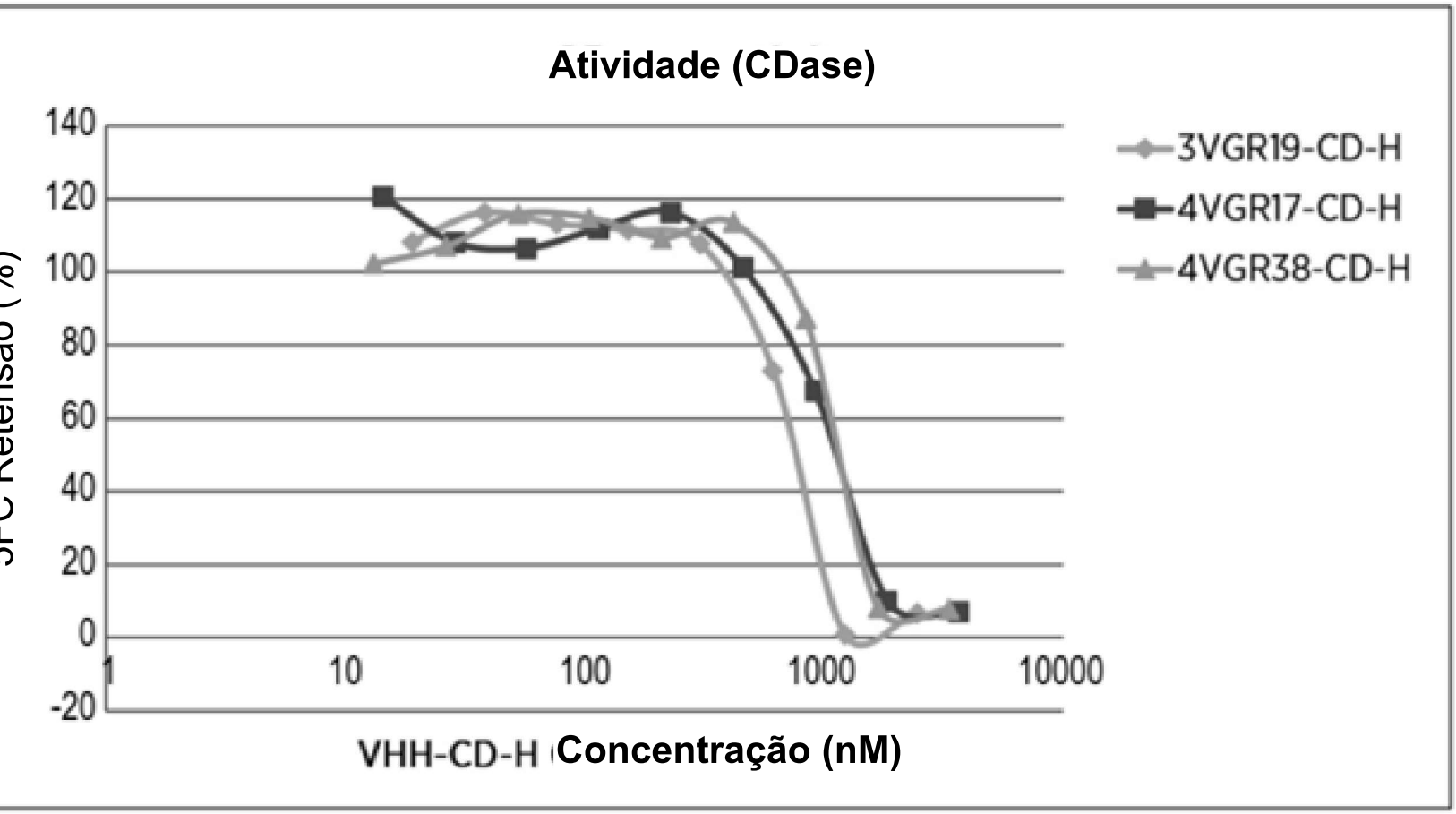

RT Área % Área Altura
1 23.791 166018 0.86 1803
2 25.100 175569 0.91 2271
3 27.566 17137303 88.57 264072
4 30.484 1086465 5.61 12074
5 32.123 266235 1.38 3909
6 33.864 511358 2.64 4851
7 41.872 6984 0.04 107
88.57%
7D12-CDoem3-H
AU
0.00 5.00 10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00 40.00 45.00 50.00
Minutos

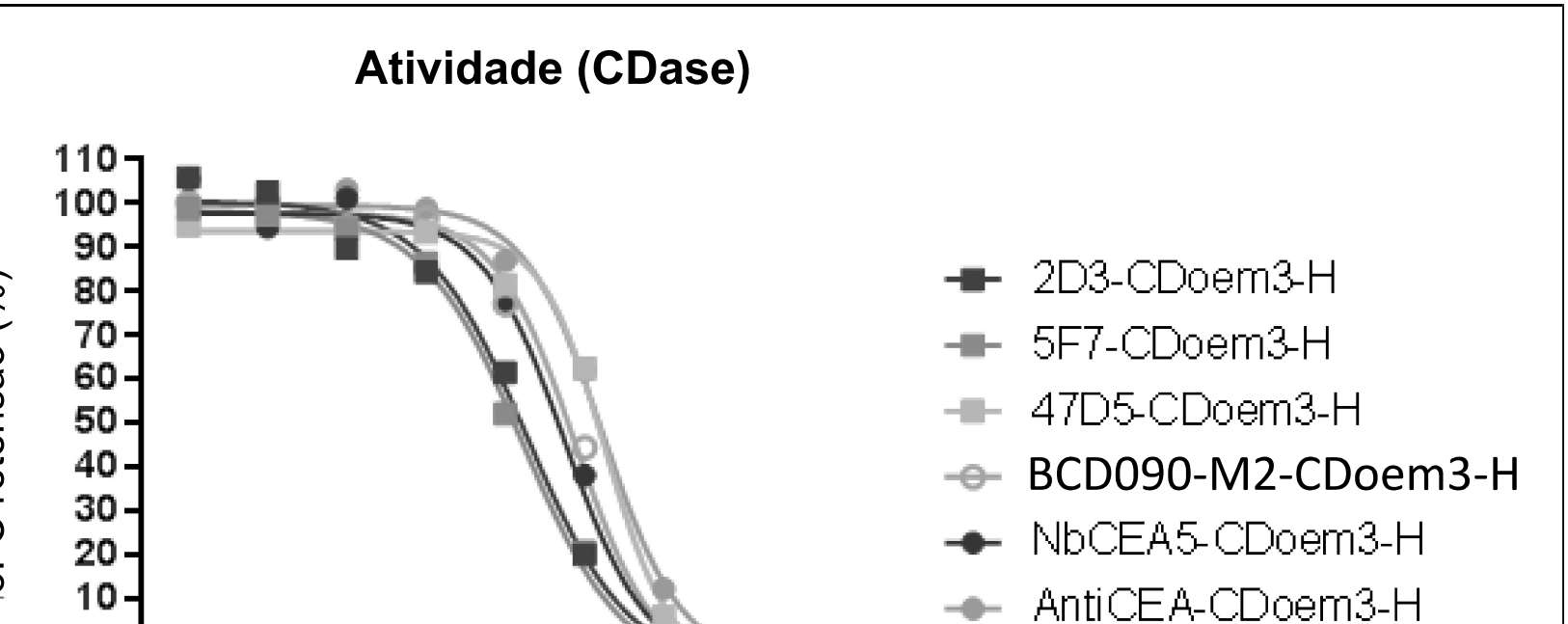

RT Área % Área Altura
1 22.784 98962 0.48 1088
2 25.080 79791 0.39 1056
3 27.419 19320128 93.50 315910
4 30.504 317256 1.54 4335
5 32.326 291212 1.41 3564
6 33.937 555098 2.69 5517
93.50%
7D12-CDoem3
AU

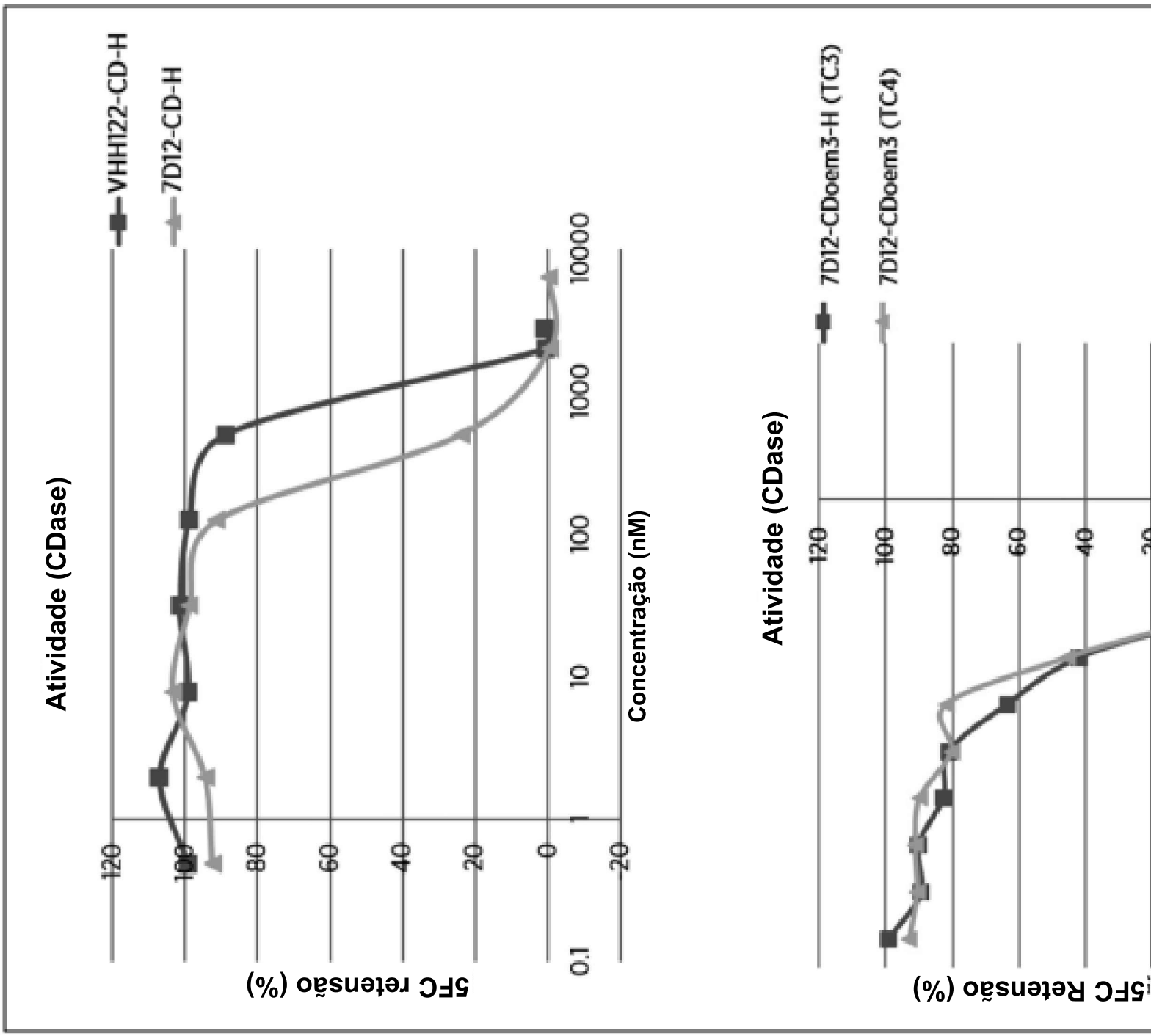


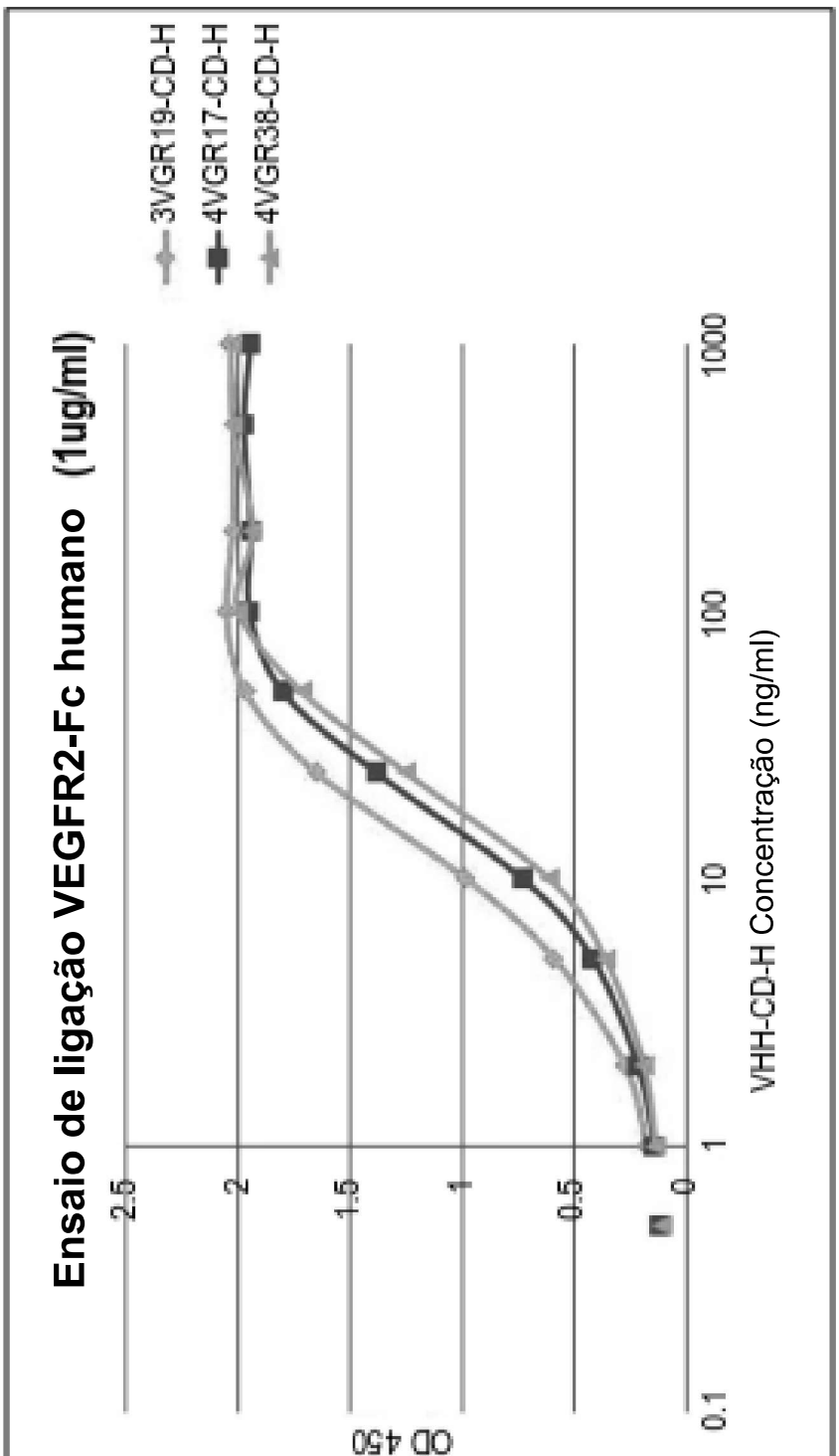
T	Área	% Área	Altura
783	386273	0.94	3072
812	39740308	97.17	639110
240	770384	1.88	5179

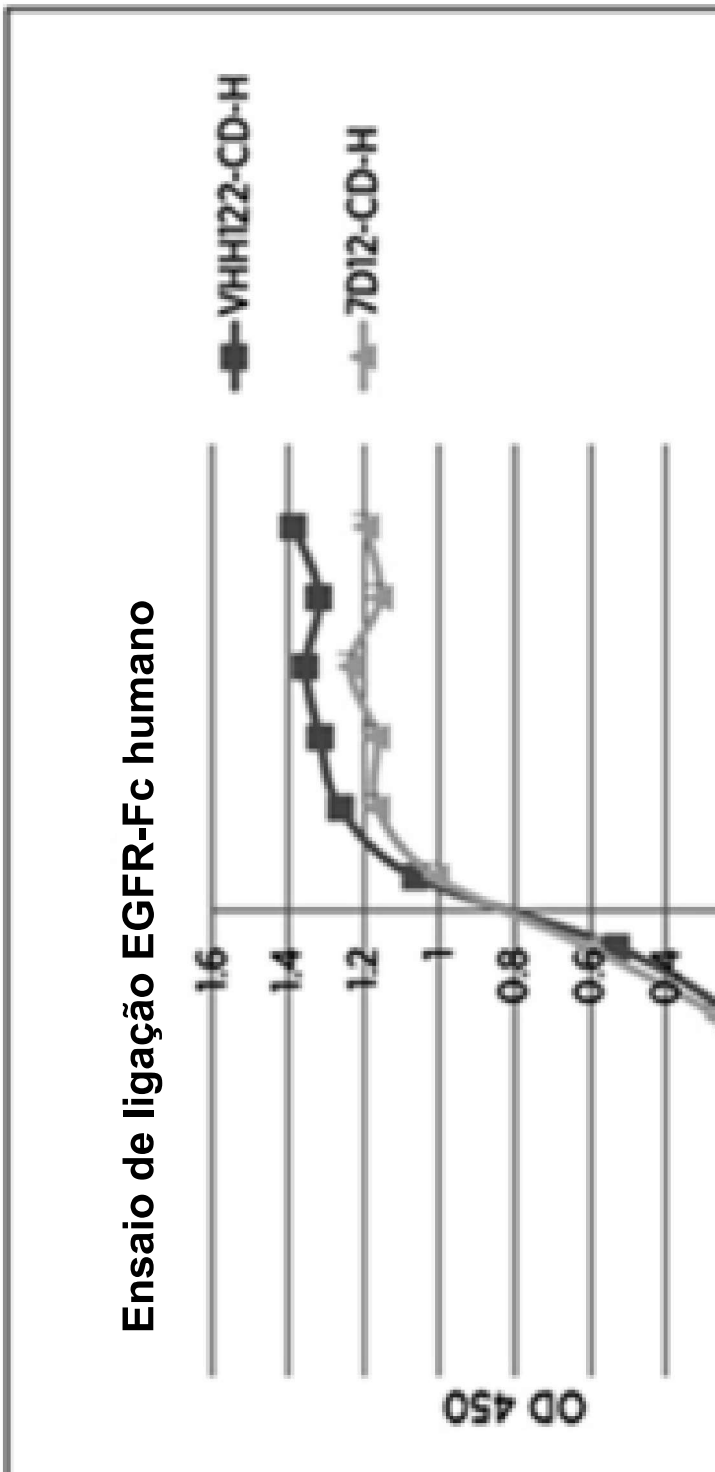
FIG. 4B

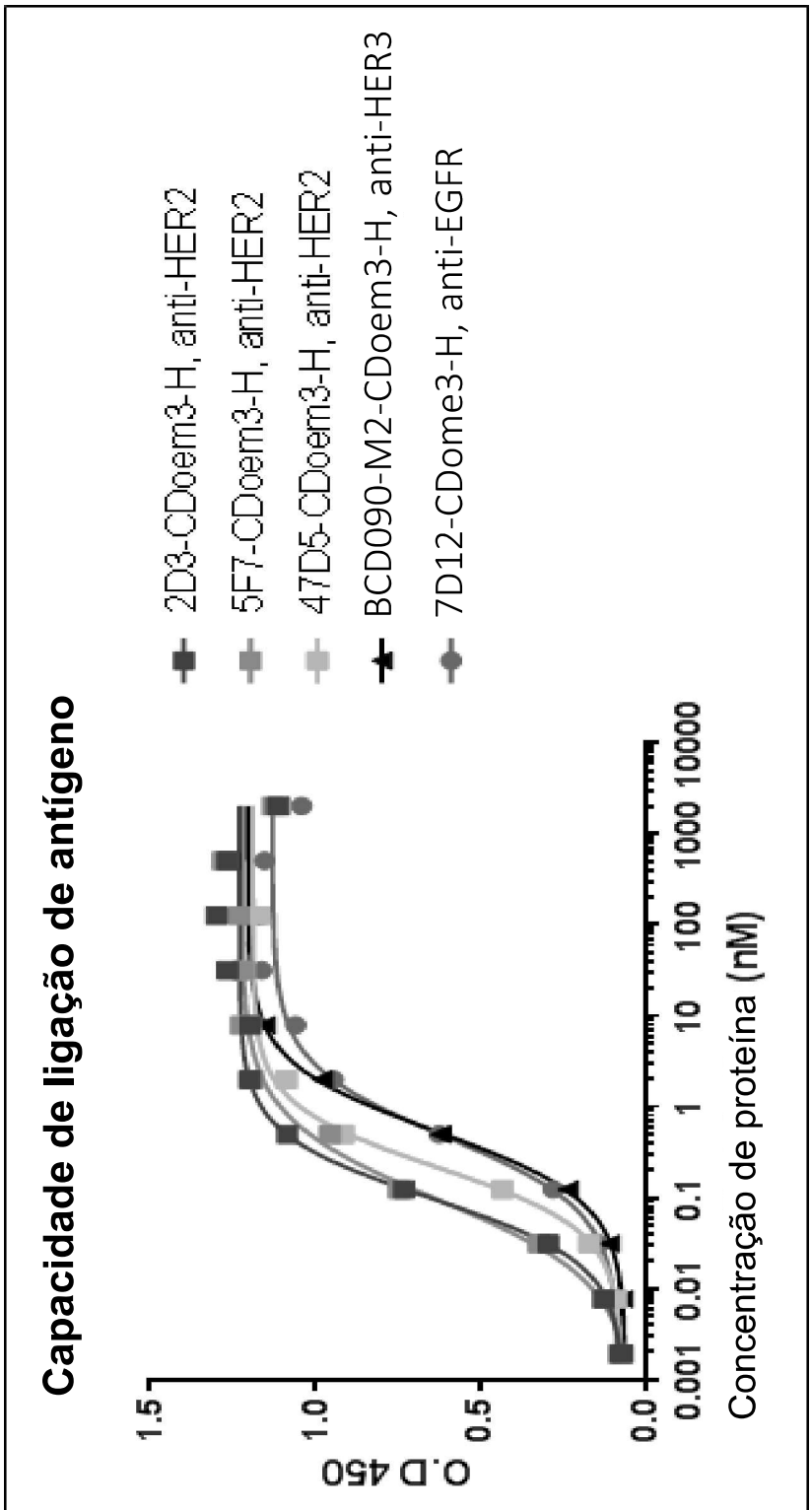

Atividade (CDase)
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
1
10
100
1000
10000
3VGR19-CD-H
4VGR17-CD-H
4VGR38-CD-H
VHH-CD-H Concentração (nM)

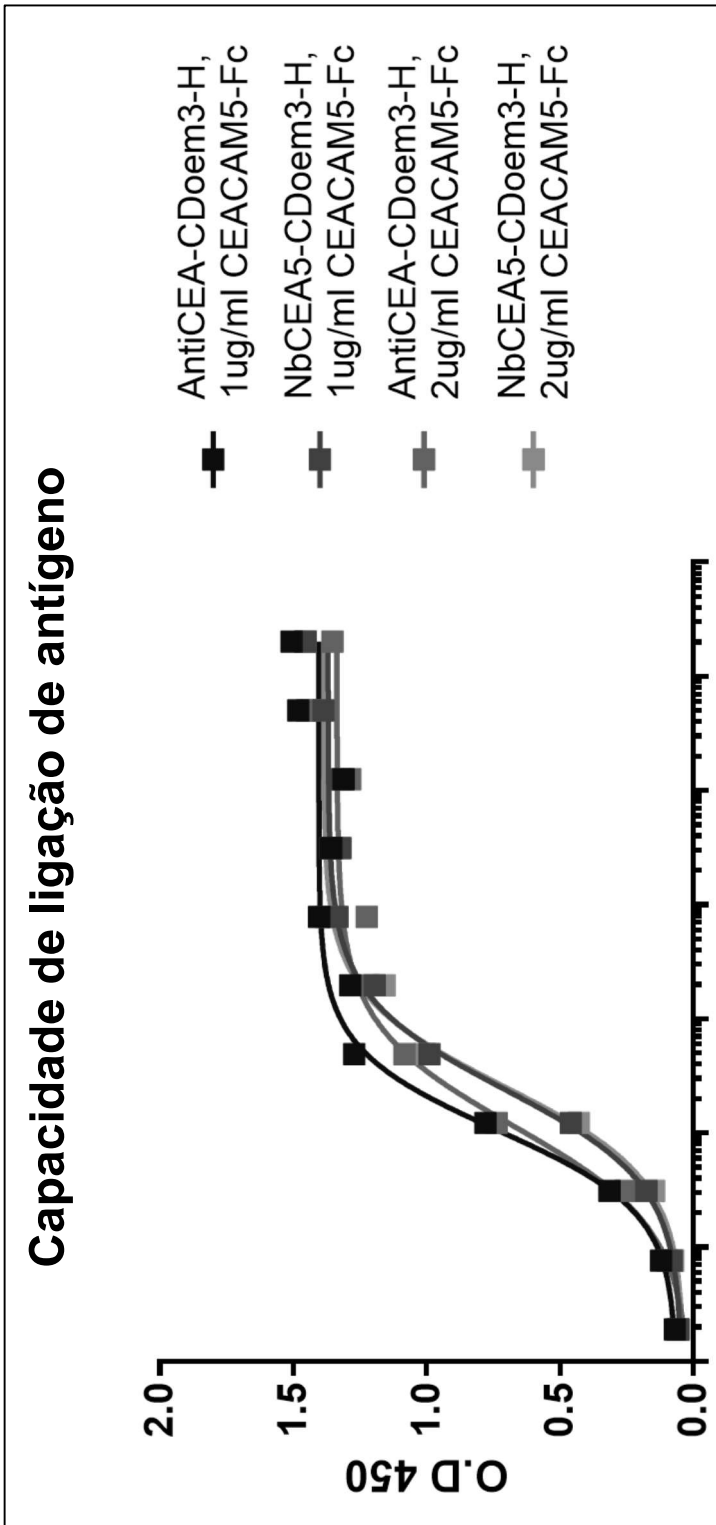

Atividade (CDase)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
2D3-CDoem3-H
5F7-CDoem3-H
47D5-CDoem3-H
BCD090-M2-CDoem3-H
NbCEA5-CDoem3-H
AntiCEA-CDoem3-H


VHH122-CD-H
7D12-CD-H
Atividade (CDase)
5FC retensão (%)
Concentração (nM)
0.1
1
10
100
1000
10000
120
100
80
60
40
20
0
20
7D12-CDoem3-H (TC3)
7D12-CDoem3 (TC4)
Atividade (CDase)
5FC Retensão (%)
120
100
80
60
40


Ensaio de ligação VEGFR2-Fc humano (1ug/ml)
3VGR19-CD-H
4VGR17-CD-H
4VGR38-CD-H
OD 450
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.1
1
10
100
1000
VHH-CD-H Concentração (ng/ml)

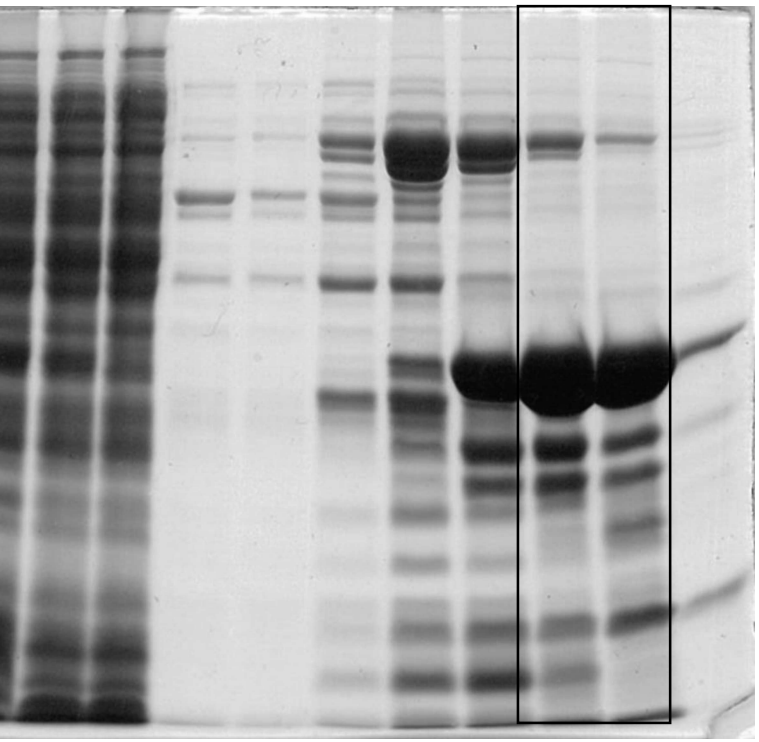

Ensaio de ligação EGFR-Fc humano
VHH122-CD-H
7D12-CD-H
OD 450
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4


Capacidade de ligação de antígeno
2D3-CDoem3-H, anti-HER2
5F7-CDoem3-H, anti-HER2
47D5-CDoem3-H, anti-HER2
BCD090-M2-CDoem3-H, anti-HER3
7D12-CDome3-H, anti-EGFR
O.D 450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000 10000
Concentração de proteína (nM)

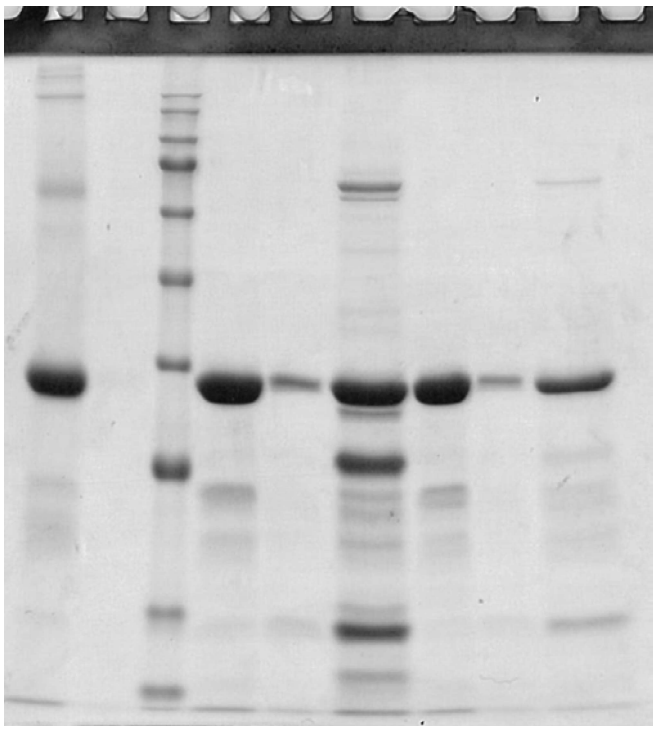

Capacidade de ligação de antígeno
AntiCEA-CDoem3-H, 1ug/ml CEACAM5-Fc
NbCEA5-CDoem3-H, 1ug/ml CEACAM5-Fc
AntiCEA-CDoem3-H, 2ug/ml CEACAM5-Fc
NbCEA5-CDoem3-H, 2ug/ml CEACAM5-Fc
O.D 450
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

GR19-CD-H

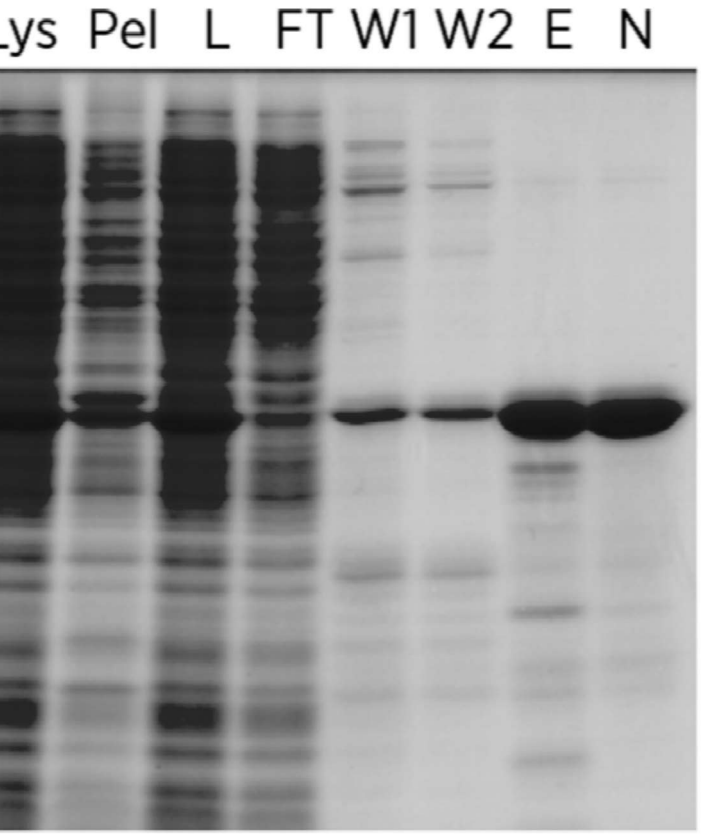
coluna de sefarose



2. Q coluna de sefarose



2-CDome3

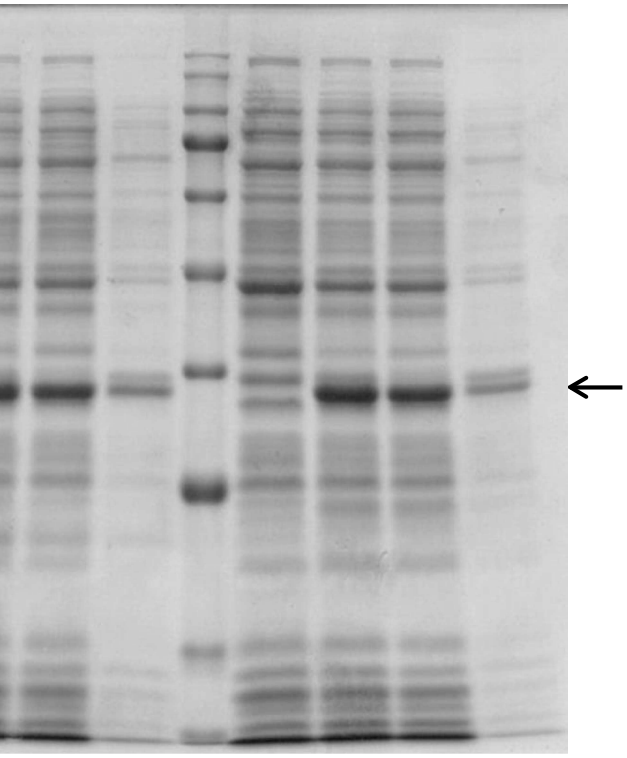


Prancha 1: M, marcador
Prancha 2: Lys, lisado
Prancha 3: Pel, sedimento (1 µl)
Prancha 4: L, carga (1 µl)
Prancha 5: FT, fluxo através (1 µl)
Prancha 6: W2, lavagem 1 (15 µl)
Prancha 7:W2, lavagem 2 (15 µl)
Prancha 8: E, amostra eluída (5 µl)
Prancha 9: N, amostra neutralizada (5 µl)

Reduzido

Huffle(R) T7 Expressão de T7

S P M I_0 I_5 S P



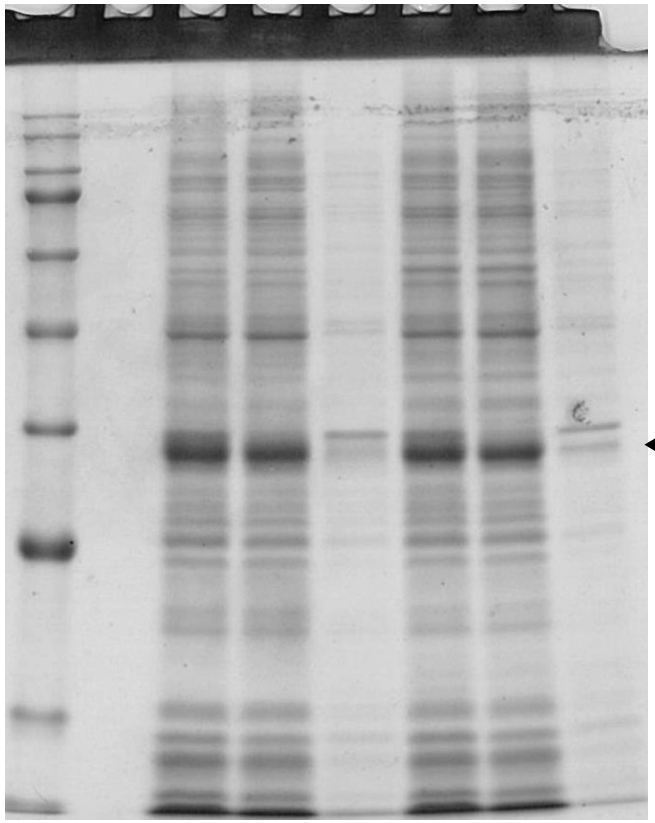
dante (Citosol)

to (corpo de inclusão)

Não redução

Expressão de T7 Expressão de SHuffle(R) T7

M I_5 S P I_5 S P

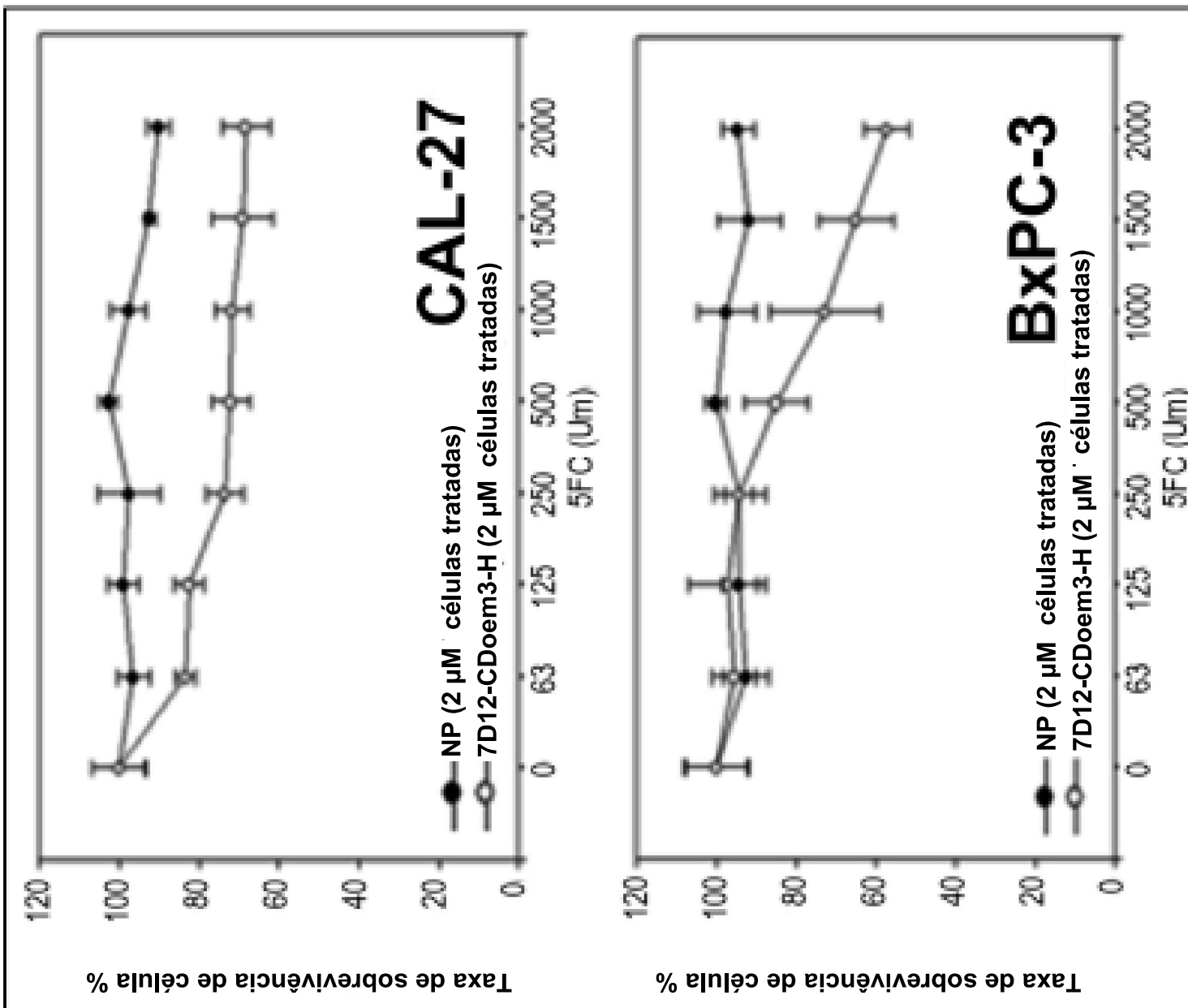


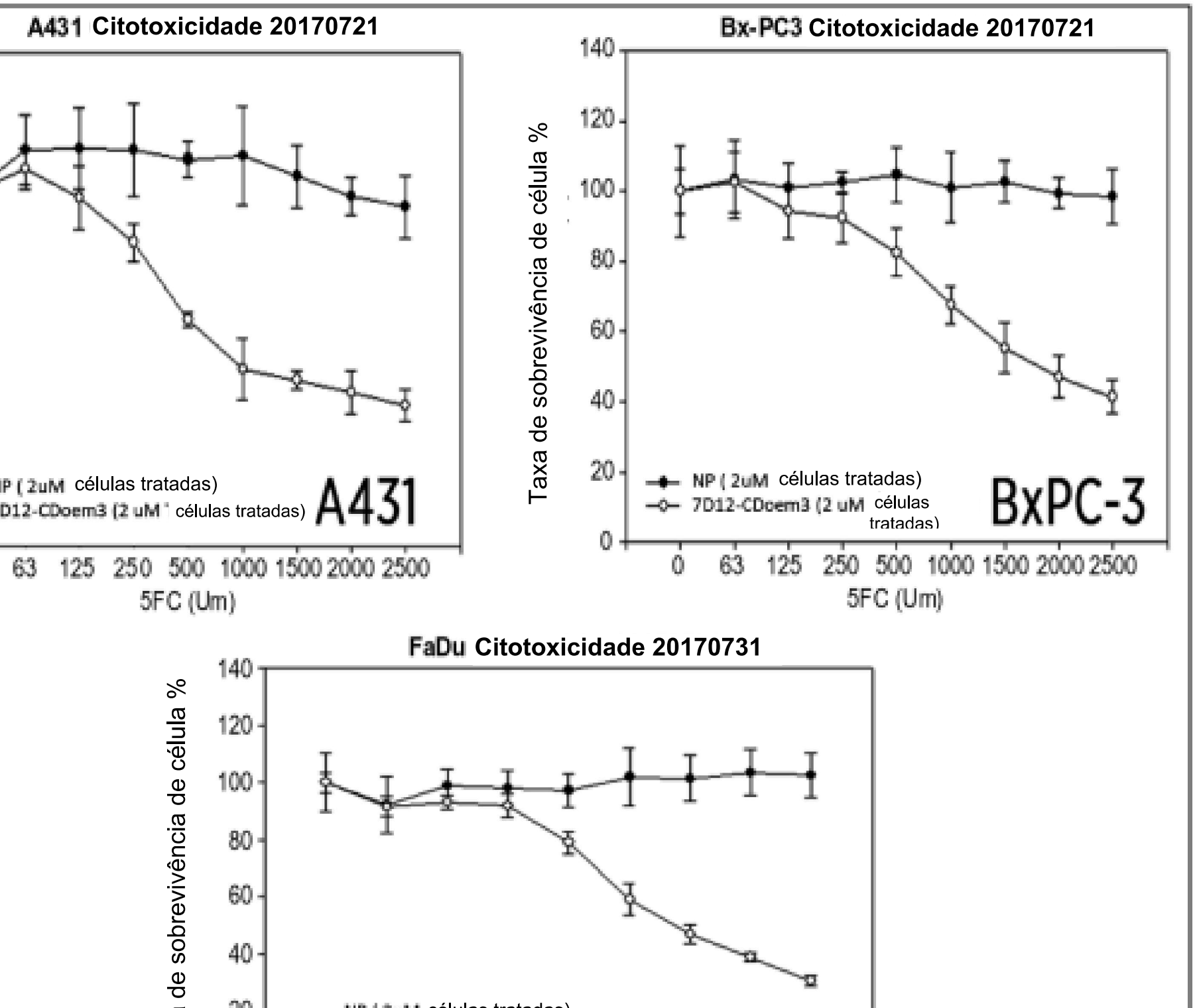
A431 Teste de Citotoxicidade WST-1
Taxa de sobrevivência de célula %
180,00
160,00
140,00
120,00
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
5FU (250 µM)
5FU (15,625 µM)
3VGR19-CD-H+ 5FC (1000 µM)
3VGR19-CD-H+ Medium
4VGR17-CD-H+ 5FC (1000 µM)
4VGR17-CD-H+ Medium
VH22-CD-H+ 5FC (1000 µM)
VH22-CD-H+ Medium
7D12-CD-H+ 5FC (1000 µM)
7D12-CD-H+ Medium
Medium+ 5FC (1000 µM)
Não tratada

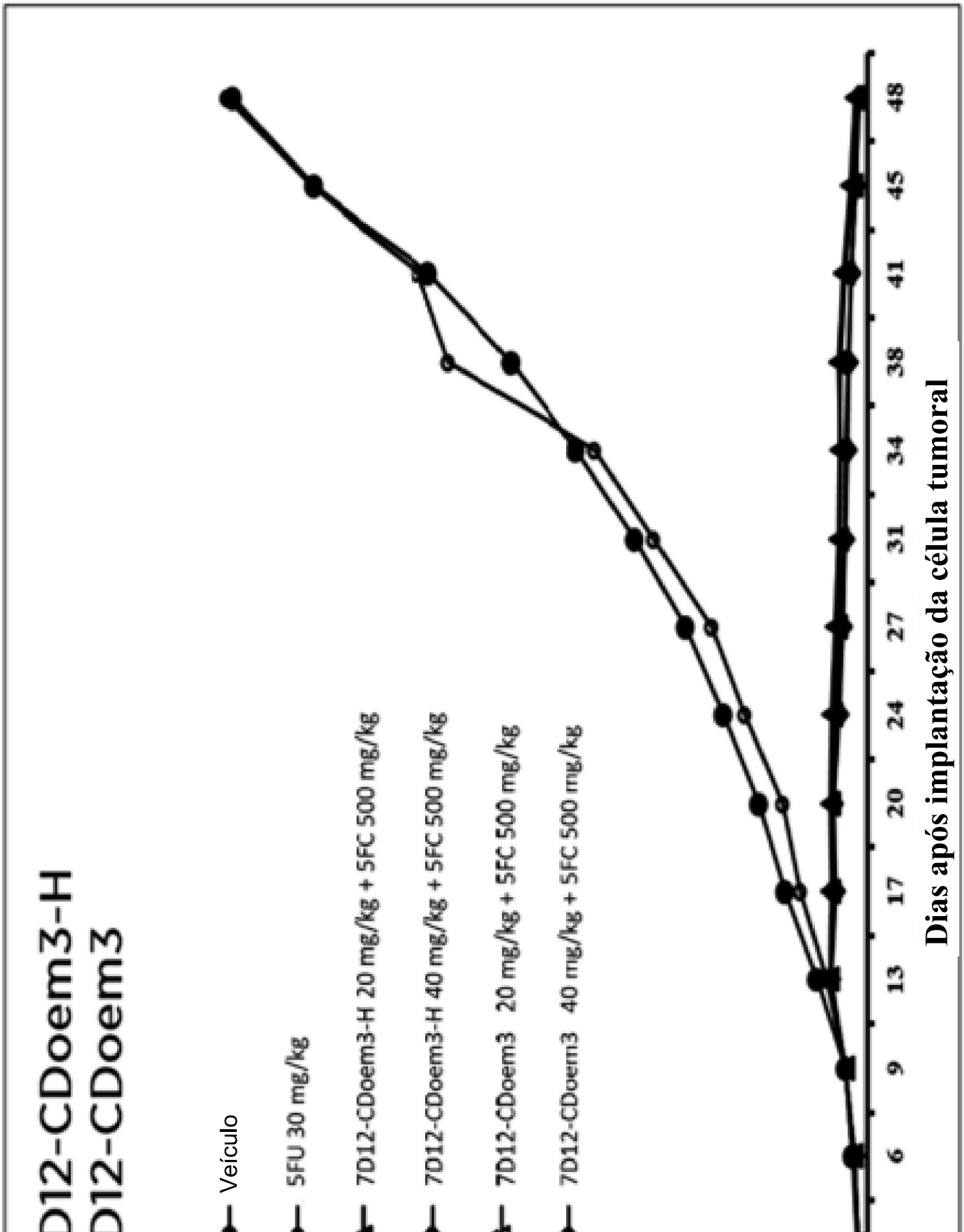
FIG. 9B

ste de Citotoxicidade WST-1
Não tratada
Medium+ 5FC (1000 µM)
7D12-CD-H+ Medium
7D12-CD-H+ 5FC (1000 µM)
VH22-CD-H+ Medium

FIG. 9A


CAL-27
BxPC-3
A431
FaDu
Taxa de sobrevivência de célula %
5FC (U/m)
NP (2 µM células tratadas)
7D12-CDoem3-H (2 µM células tratadas)
0
20
40
60
80
100
120
0
63
125
250
500
1000
1500
2000


A431 Citotoxicidade 20170721
células tratadas)
células tratadas)
A431
63 125 250 500 1000 1500 2000 2500
5FC (Um)
Bx-PC3 Citotoxicidade 20170721
Taxa de sobrevivência de célula %
140
120
100
80
60
40
20
0
NP (2uM células tratadas)
7D12-CDoem3 (2 uM células tratadas)
BxPC-3
0 63 125 250 500 1000 1500 2000 2500
5FC (Um)
FaDu Citotoxicidade 20170731
Taxa de sobrevivência de célula %
140
120
100
80
60
40


D12-CDoem3-H
D12-CDoem3
Veículo
5FU 30 mg/kg
7D12-CDoem3-H 20 mg/kg + 5FC 500 mg/kg
7D12-CDoem3-H 40 mg/kg + 5FC 500 mg/kg
7D12-CDoem3 20 mg/kg + 5FC 500 mg/kg
7D12-CDoem3 40 mg/kg + 5FC 500 mg/kg
6
9
13
17
20
24
27
31
34
38
41
45
48
Dias após implantação da célula tumoral

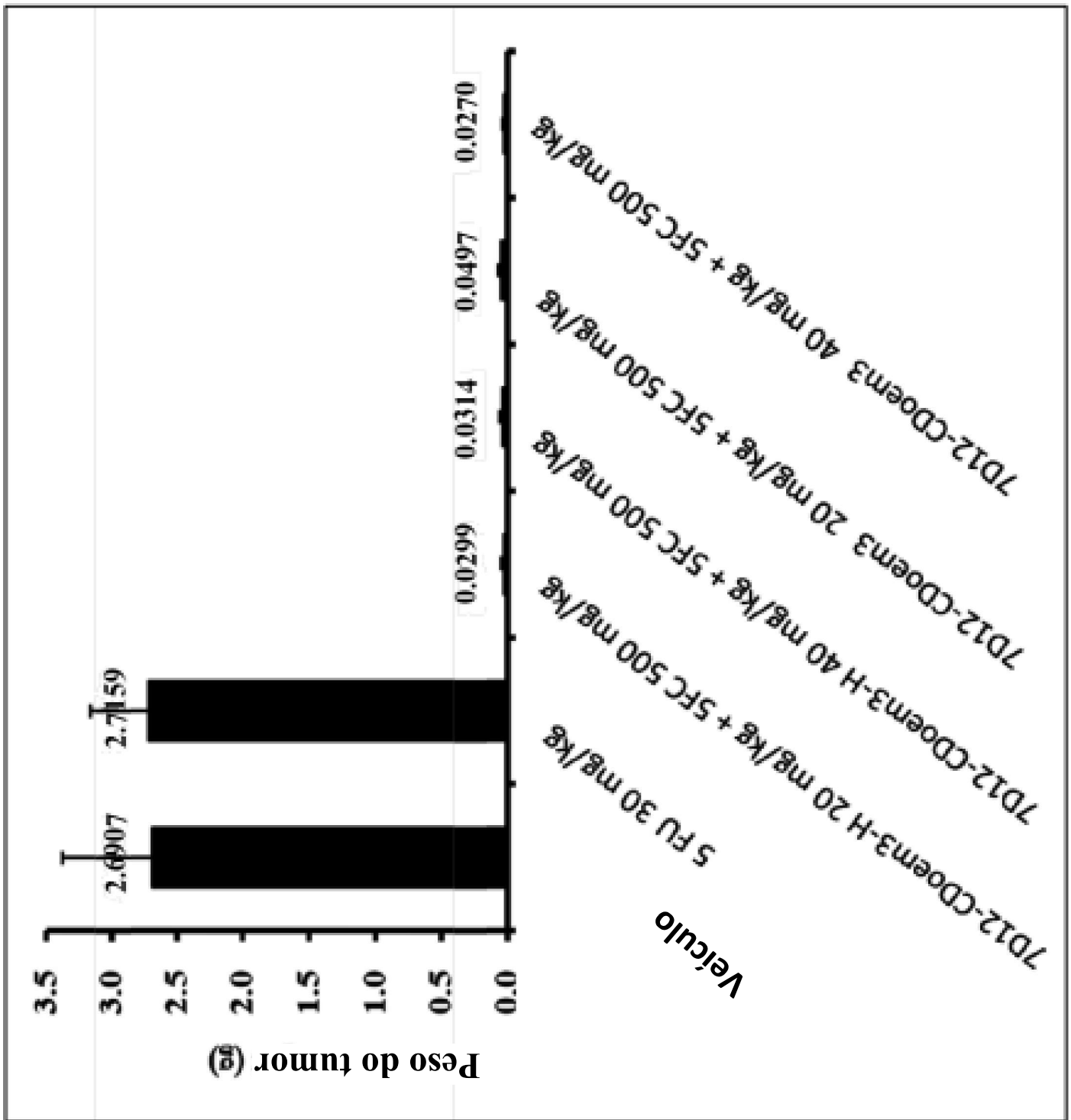

Peso do tumor (g)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
2.6907
2.7159
0.0299
0.0314
0.0497
0.0270
Veículo
5 FU 30 mg/kg
7D12-CDoem3-H 20 mg/kg + 5FC 500 mg/kg
7D12-CDoem3-H 40 mg/kg + 5FC 500 mg/kg
7D12-CDoem3 20 mg/kg + 5FC 500 mg/kg
7D12-CDoem3 40 mg/kg + 5FC 500 mg/kg

FIG. 12

Código	rendimento de purificação (mg/mL)	atividade de CDase (ECS50, μm)	Capacidade de ligação de EGFR (EC50, nM)		
TC3-001, S12V	2.356	NT	0.115	0.118	NT
TC3-002, V13A	1.085	NT	0.122	NT	NT
TC3-003, T15V	2.538	NT	0.129	NT	NT
TC3-004, G16D	0.884	NT	0.146	NT	NT
TC3-005, S18D	0.437	NT	0.154	NT	NT
TC3-006, S18E	0.414	NT	0.14	NT	NT
TC3-007, K88R	0.464	NT	0.152	NT	NT
TC3-008, P89A	0.554	NT	0.12	NT	NT
TC3-009, K88A	0.357	NT	0.084	0.168	NT
TC3-010, K88D	0.692	NT	0.083	0.138	NT
TC3-011, K88S	0.74	NT	0.094	0.172	NT
TC3-012, K88T	1.034	NT	0.08	0.115	NT
TC3-013, P89D	0.082 0.377	NT	0.089	0.388	0.062
TC3-014, P89E	0.322	NT	0.13	NT	NT
TC3-015, T92D	0.379	NT	0.095	0.149	NT
TC3-016, T92E	0.672	NT	0.094	0.144	NT
TC3-017, T92G	0.489	NT	0.105	0.125	NT
TC3-018, T92H	0.293	NT	0.109	0.143	NT
TC3-019, T92Q	0.443	NT	0.116	NT	NT
TC3-020, A93D	0.105 0.1	NT	0.081	0.175	0.205
TC3-021, A93E	NT	NT	NT	NT	NT
TC3-022, I94V	0.801	NT	0.056	0.083	NT
TC3-023, I94A	0.447	NT	0.103	0.096	NT
TC3-024, I94T	0.627	NT	0.129	NT	NT
TC3-025, I94R	0.783	NT	0.12	NT	NT
TC3-026, I94Q	0.636	NT	0.094	0.1	NT
TC3-027, I94N	0.635	NT	0.124	NT	NT
TC3-028, Y224A	0.351	1.49	NT		
TC3-029, Y224H	0.176	0.29	NT		
TC3-030, T225D	0.433	-	NT		
TC3-031, T226E	0.379	-	NT		
TC3-032, M232N	0.431	-	NT		
TC3-033, M232A	0.543	-	NT		
TC3-034, M232K	0.547	-	NT		
TC3-035, M232Q	0.259	-	NT		

FIG. 13A

...opo 1	Epítopo 2	Epítopo 3	Epítopo 6	Rendimento de purificação (mg/mL)	Ligação de rhEGFR (EC50: nM)	Atividade CDase (EC50: nM)
..., T15V	K88R, P89A, I94V		V268A	1.081	0.02	0.06
..., T15V	K88R, P89A, I94V		V268T	0.125	0.16	0.5
				0.549	0.08	0.09
..., T15V	K88R, P89A, I94V		V269T	0.518	0.07	0.11
...13A	K88D	I94R	V268A	0.355	0.05	0.05
...16D	K88D	I94R	V268A	0.019	NT	NT
...18D	K88D	I94R	V268A	0.026	NT	NT
...13A	K88T	I94R	V268A	0.399	0.04	0.05
...16D	K88T	I94R	V268A	0.118	0.08	0.14
...18D	K88T	I94R	V268A	0.043	NT	NT
...13A	K88D	I94Q	V268A	0.104	0.16	0.28
...16D	K88D	I94Q	V268A	0.032	NT	NT
...18D	K88D	I94Q	V268A	0.033	NT	NT
...13A	K88T	I94Q	V268A	0.274	0.04	0.07
...16D	K88T	I94Q	V268A	0.127	0.08	0.14
...18D	K88T	I94Q	V268A	0.017	NT	NT
...13A	K88D	I94R	V268T	0.223	0.1	0.14
...16D	K88D	I94R	V268T	0.052	NT	NT
...18D	K88D	I94R	V268T	0.026	NT	NT
...13A	K88T	I94R	V268T	0.182	0.12	0.15
...16D	K88T	I94R	V268T	0.174	0.1	0.14
...18D	K88T	I94R	V268T	0.07	NT	NT
...13A	K88D	I94Q	V268T	0.107	0.2	1.42
...16D	K88D	I94Q	V268T	0.013	NT	NT
...18D	K88D	I94Q	V268T	0.021	NT	NT
...13A	K88T	I94Q	V268T	0.341	0.09	0.12
...16D	K88T	I94Q	V268T	0.014	NT	NT
...18D	K88T	I94Q	V268T	0.023	NT	NT
...13A	K88D	I94R	V269T	0.168	0.16	0.55
...16D	K88D	I94R	V269T	0.019	NT	NT
...18D	K88D	I94R	V269T	0.017	NT	NT
...13A	K88T	I94R	V269T	0.343	0.14	0.14
...16D	K88T	I94R	V269T	0.114	0.15	1.7
...18D	K88T	I94R	V269T	0.101	0.34	NA

Epítopo 2	Epítopo 3	Epítopo 4	Epítopo 6	Rendimento após purificação (mg/200mL batch)	Ligação de rhEGFR (EC50:nM)	Atividade CDase (EC50:nM)	S2000 SEC-HPLC RT (27min) Pico Principal
K88R, P89A, I94V			V268A	**7.5**	**0.07**	**10.35**	**89.34**
K88R, P89A, I94V			V268A, V269T	**5.6**	**0.07**	**10.32**	**81.37**
K88R, P89A, I94V		Y224H	V268A	**5.9**	**0.08**	**11.95**	**72.9**
K88D	I94R		V268A	**0.9**	**0.1**	**11.27**	**83.98**
K88T	I94R		V268A	**3.3**	**0.13**	**13.42**	**78.38**
K88T	I94R		V268A, V269T	**1.5**	**0.12**	**15.62**	**66.2**
K88T	I94R	Y224H	V268A	**2.3**	**0.11**	**12.17**	**72.09**
K88T	I94R		V268A	**1.9**	**0.11**	**12.13**	**88.35**
K88T	I94R		V268A	**1.9**	**0.1**	**10.77**	**93.97**
K88T	I94Q		V268A	**0.9**	**0.1**	**11.59**	**81.39**
				2.1	**0.14**	**13.44**	**86.94**

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Exenatido	KLH
Donor 1							PE
Donor 2				P			PE
Donor 3							PE
Donor 4							PE
Donor 5							PE
Donor 6							PE
Donor 7				P		P	PE
Donor 8							PE
Donor 9						P	PE
Donor 10	PE	P	P	P	PE		PE
Donor 11							PE
Donor 12							PE
Donor 13	P					P	PE
Donor 14				P	P	P	PE
Donor 15		P	P	P			PE
Donor 16				P	P	P	PE
Donor 17							E
Donor 18							PE
Donor 19							PE
Donor 20							PE
Donor 21							PE
Donor 22	P			P	P		PE
Donor 23					P		PE
Donor 24							PE
Donor 25				P		P	PE
Donor 26						P	PE
Donor 27							PE
Donor 28						P	P
Donor 29							PE
Donor 30	PE			PE		PE	PE
Donor 31	P					PE	PE
Donor 32			P		P	P	PE
Donor 33						P	PE
Donor 34			E			P	PE
Donor 35						P	PE
Donor 36					E	PE	PE
Donor 37				P			PE
Donor 38				P		P	PE
Donor 39						PE	PE
Donor 40							P
Donor 41						P	PE
Donor 42				E			PE
Donor 43							P
Donor 44						P	PE
Donor 45		E			P		
Donor 46							P

e CD	TC4-WT	TC4-44	TC4-50	TC4-51	TC-87
nM)	33.3	23.43	19.67	16.35	24.45

ka1(1/Ms)	kd1(1/s)	ka2(1/s)	kd2(1/s)	KD(M)
2.15E+06	0.04414	0.009098	2.71E-04	**5.93E-10**
1.22E+06	0.03604	0.007203	2.71E-04	**1.07E-09**
1.05E+06	0.05938	0.01108	1.86E-04	**9.35E-10**
6.90E+05	0.08054	0.01145	2.01E-04	**2.02E-09**
6.96E+05	0.07411	0.01099	2.13E-04	**2.03E-09**
7.63E+05	0.05579	0.008993	1.58E-04	**1.27E-09**

FIG. 15

RESUMO

"PROTEÍNAS DE FUSÃO DE ANTICORPO CITOSINA-DESAMINASE DE DOMÍNIO ÚNICO"

A revelação se refere às proteínas de fusão, métodos para produzir proteínas de fusão e métodos de uso de proteínas de fusão, em que as proteínas de fusão compreendem um anticorpo funcional de domínio único (sdAb) ou uma variante funcional do mesmo e uma proteína citosina desaminase (CD) ou uma proteína funcional variante do mesmo, opcionalmente conectado via um ligante peptídico. As proteínas de fusão da revelação também têm atividade de CD. A revelação também se refere a composições ou formulações farmacêuticas compreendendo essas proteínas de fusão e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, bem como usos médicos dessas proteínas de fusão.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: PCT IB2019000013 - Linstagem de Sequências.txt
- Data de Geração do Código: 26/06/2020
- Hora de Geração do Código: 20:19:01
- Código de Controle:
  - Campo 1: 805CAC6107C4B700
  - Campo 2: E7861895C04C3439