



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

(21) BR 112014015922-0 A2



(22) Data do Depósito: 22/12/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2020

(54) Título: PROTEÍNA DE FUSÃO ANTICÂNCER

(51) Int. Cl.: C07K 14/705; C12N 15/62; C12N 15/12; A61K 38/17; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 28/12/2011 PL P.397595.

(71) Depositante(es): ADAMED SP. ZO.O..

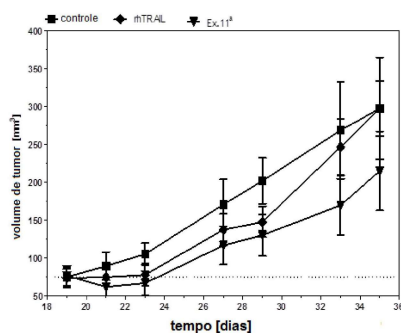
(72) Inventor(es): JERZY SZCZEPAN PIECZYKOLAN; SEBASTIAN DOMINIK PAWLAK; BARTLOMIEJ MACIEJ ZEREK; PIOTR KAMIL RÓZGA.

(86) Pedido PCT: PCT IB2012057657 de 22/12/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/098755 de 04/07/2013

(85) Data da Fase Nacional: 26/06/2014

(57) Resumo: PROTEÍNA DE FUSÃO ANTICÂNCER A presente invenção descreve uma proteína de fusão compreendendo domínio (a) que é um fragmento funcional de sequência de proteína hTRAIL, cujo fragmento começa com um amino ácido em uma posição não inferior a hTRAIL 95, ou um homólogo do dito fragmento funcional que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, preferencialmente 85% de identidade e terminando com o amino ácido hTRAIL281; e pelo menos um domínio (b) que é uma sequência de peptídeo efector citolítico de formação de poros na membrana celular, em que a sequência de domínio (b) é fixada ao terminal C ou terminal N de domínio (a). A proteína de fusão pode ser utilizada para o tratamento de doenças do câncer.



## **PROTEÍNA DE FUSÃO ANTICÂNCER**

### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção relaciona-se ao campo de proteínas de fusão terapêuticas, especialmente as proteínas de fusão recombinantes. Mais particularmente, a invenção relaciona-se às proteínas de fusão compreendendo o fragmento de uma sequência da proteína humana solúvel TRAIL e uma sequência de poros que formam peptídeos na célula ou na membrana da mitocôndria, composições farmacêuticas que as contém, seu uso em terapia, especialmente como agentes anticâncer, e a sequências de polinucleotídeo codificando as proteínas de fusão, vetores de expressão contendo as sequências de polinucleotídeos, e as células hospedeiras que contêm esses vetores de expressão.

**[0002]** A proteína TRAIL (Ligando de Indução de Apoptose Relacionada ao Fator de Necrose do Tumor), um membro da família de citocinas, também conhecida como Apo2L (Ligando Apo2), é um potente ativador de apoptose em células tumorais e em células infectadas por vírus. TRAIL é um ligando que ocorre naturalmente no corpo. A proteína TRAIL, a sua sequência de amino ácidos, codificando a sequência de DNA SEQ. N°s. e sistemas de expressão de proteína foram revelados pela primeira vez na EP0835305A1.

**[0003]** A proteína TRAIL exerce a sua atividade anticâncer combinando à superfície pro-apoptótica os receptores de TRAIL 1 e 2 (TRAIL-R1/R2) e ativação subsequente desses receptores. Esses receptores, também conhecidos como DR4 e DR5 (receptor de morte 4 e receptor de morte 5), são membros da família do receptor TNF e são sobreexpressos por diferentes tipos de células de câncer. A ativação desses receptores podem induzir o percurso de sinalização externa de apoptose independente do gene p53 supressor, que por caspase 8 ativada causa a ativação de



caspases executivos e desta forma a degradação de ácidos nucleicos. O caspase-8 liberado por ativação do TRAIL pode causar também a liberação de proteína Bid truncada, que é translocate para a mitocôndria, em que ela estimula a liberação de citocromo C, amplificando então indiretamente o sinal apoptótico a partir dos receptores de morte.

**[0004]** A TRAIL age de maneira seletiva sobre as células tumorais, essencialmente sem induzir a apoptose em células saudáveis que mostram resistência a essa proteína. Portanto, o enorme potencial de TRAIL foi reconhecido como um agente anticâncer que age sobre uma ampla gama de tipos de câncer diferentes, incluindo malignidades hematológicas e tumores sólidos, enquanto poupa as células normais e exerce potencialmente relativamente poucos efeitos colaterais.

**[0005]** A proteína TRAIL é uma proteína da membrana tipo II que tem a extensão de 281 aminoácidos, e sua região extracelular compreendendo resíduos de aminoácidos 114 a 281 ao ocorrer a clivagem por protease forma a molécula de sTRAIL solúvel de tamanho 20 kDa, que é ativa biologicamente também. As duas formas, TRAIL e sTRAIL, são capazes de acionar a apoptose via a interação com receptores de TRAIL presentes nas células alvo. Forte atividade antitumoral e toxicidade sistêmica muito baixa de parte solúvel da molécula de TRAIL foi demonstrada utilizando testes de linhas de células. Também, estudos clínicos preliminares em humanos com TRAIL solúvel humano recombinante (rhTRAIL) que têm sequência de aminoácido que corresponde a aminoácidos 114 a 281 de hTRAIL, conhecida sob o INN dulanermina, mostrou sua boa tolerância e ausência de toxicidade que limita a dose. Os efeitos tóxicos de proteína TRAIL recombinante em células do fígado reportaram até agora parecerem como estando associadas com

a presença de modificação, ou seja, etiquetas de polihistidina, enquanto TRAIL sem formatação não mostrou nenhuma toxicidade sistêmica.

**[0006]** Os fragmentos de TRAIL mais curtos do que 114 a 281 também são capazes de ligar com receptores de morte de membrana e induzir a apoptose via esses receptores, por exemplo, como recentemente reportado no EP 1 688 498 para mutante permutado circularmente recombinante de hTRAIL 122 a 281.

**[0007]** No entanto, em ensaios clínicos adicionais em pacientes a real eficácia de TRAIL como uma monoterapia foi provada como sendo baixa. Foi também problemática a resistência primária ou adquirida a TRAIL mostrada por muitas células de câncer (vide por exemplo WO2007/022214). A resistência pode ser devido a diversos mecanismos e pode ser específica para um tipo de câncer e/ou depender do paciente (Thorburn A, Behbakht K, Ford H. TRAIL receptor-targeted therapeutics: resistance mechanisms and strategies to avoid them. Drug Resist Updat 2008; 11: 17 a 24). Essa resistência limita a utilidade de TRAIL como um agente anticâncer. Apesar de o mecanismo de resistência a TRAIL não ter sido inteiramente compreendido, acredita-se que ele pode se manifestar em diferentes níveis de percurso de apoptose induzida por TRAIL, variando a partir do nível de receptores de superfície celular até os caspases executivos dentro do percurso de sinalização.

**[0008]** A fim de superar essa baixa eficiência e a resistência de tumores a TRAIL, diversas terapias combinadas com agentes de rádio e de quimioterapia foram projetados, que resultaram em efeito apoptótico sinérgico (WO2009/002947; A. Almasan e A. Ashkenazi, Cytokine Growth Factor Reviews 14 (2003) 337 a 348; RK Srivastava, Neoplasia, Vol 3, No. 6, 2001, 535 a 546, Soria

JC et al., J. Clin. Oncology, Vol 28, No. 9 (2010), p. 1527 a 1533). O uso de rhTRAIL para tratamento de câncer combinado com agentes quimioterápicos convencionais selecionados (paclitaxel, carboplatin) e anticorpos de anti-VEGF monoclonais estão descritos no WO2009/140469. No entanto, uma dita combinação implica necessariamente em deficiências bastante conhecidas de quimioterapia ou radioterapia convencionais. A técnica anterior é silente, no entanto, sobre quaisquer dados que sugerem abolir a resistência celular ao TRAIL obtido por fusão de proteína TRAIL com outras proteínas ou fragmentos desses.

**[0009]** Ademais, o problema relacionado com a terapia de TRAIL apareceu como sendo a sua baixa estabilidade e rápida eliminação a partir do corpo após a administração.

**[0010]** O efeito de destruição de células de câncer e inibição de proliferação de tumor como resultado de desintegração (descontinuidade) da membrana celular ou membrana mitocondrial é conhecido. Existe também tentativas de utilizar substâncias com efeito citolítico capaz de desintegração de membrana tanto como uma terapia anti-câncer quanto terapia anti-câncer adjunta.

**[0011]** Muitos peptídeos e proteínas naturais e sintéticas que têm atividade citolítica são conhecidas. Os peptídeos citolíticos estão também descritos como peptídeos de formação de poros ou citolisinas. As interações de peptídeos de formação de poros com a superfície da membrana podem ser baseadas nas interações eletrostáticas não específicas do peptídeo de carga positiva com superfície de carga negativa de membrana celular.

**[0012]** Esses peptídeos têm geralmente o caráter catiônico, de modo que eles sejam capazes de interações eletrostáticas com superfícies com partículas de carga predominantemente negativa. Ao haver contato e interação de

um peptídeo citolítico com lipídios na superfície celular, e após a penetração dentro da célula com os lipídios na superfície da membrana mitocondrial, ocorre a interrupção da continuidade da membrana celular, seguido pela formação de poros de transmembrana de tamanho pequeno, pela qual o vazamento dos conteúdos do citoplasma ocorre, incluindo íons, fora da célula, resultando no rápido desequilíbrio irreversível de eletrólito na célula, a lise celular e a morte da mesma.

**[0013]** As interações dos peptídeos de formação de poro com a superfície da membrana pode incluir também interações com receptores específicos presentes na superfície.

**[0014]** Os peptídeos citolíticos conhecidos que ocorrem naturalmente de origem bacterial, vegetal ou animal capazes de formar poros na membrana celular são geralmente chamados de hemolisinas, porque elas causam a lise dos glóbulos vermelhos e de outras células eucarióticas. Essas toxinas incluem cecropina A e B, aureína 1.2, citropina 1.1, defensina (HNP-2), lactoferricina B, taquiplesina, PR-39, citolisinas de *Enterococcus faecalis*, delta hemolisina, toxina de difteria, citolisina de *Vibrio cholerae*, toxina a partir de *Actinia equina*, granulicina, peptídeos líticos de *Streptococcus intermedius*, peptídeos líticos lentivirais, leucotoxinas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, magainina, melitina, linfotoxina, encefalina, paradaxina, perforina (em particular o fragmento de terminal N desses), perfringolisina O (PFO/toxina teta) a partir de *Clostridium perfringens*, e estreptolisinas. A utilização desses como medicamentos está limitada pela sua capacidade de causar hemólise.

**[0015]** Os peptídeos citolíticos naturais estão descritos, por exemplo, em R. Smolarczyk et al., Postepy Hig. Med. Dosw., 2009; 63: 360 a 368.

**[0016]** São também conhecidos os peptídeos de formação de poros citolíticos sintéticos. Eles são projetados para serem desprovidos de propriedades hemolíticas, para serem menos imunogênicos, ou para terem superfícies que permitem alta especificidade de ligação aos alvos celulares tal como por exemplo receptores da família de VEGFR (receptor de fator de crescimento endotelial vascular) e receptores da família de EGFR (receptor de fator de crescimento epidermal). Eles são geralmente híbridos de fragmentos de peptídeos citolíticos naturais, tal como híbridos de fragmento de cecropina A e fragmento MA (1-12) de magainina 2 CA (1-8) ou um híbrido de fragmento de cecropina A e de fragmento de CAMEL de melitina (CA(1-7) MEL(2-9)). Existe também peptídeos citolíticos sintéticos conhecidos D-K<sub>4</sub>-L<sub>2</sub>-R<sub>9</sub> e D-K<sub>6</sub>-L<sub>9</sub>, que consiste de lisina de aminoácidos, arginina e leucina, parte das quais está na forma de aminoácidos D. Existe também os peptídeos quiméricos sintéticos RGD-4C<sub>D</sub>(KLAKLAK)<sub>2</sub> conhecidos, que contém a ligação de motivo RGD com integrina  $\alpha_v\beta_3$  e um domínio efetor composto de aminoácidos D KLAKLAKKLAKLAK, e PTD-5<sub>D</sub>(KLAKLAK)<sub>2</sub> que contém motivo de PTD-5 que permite a penetração nas células e um domínio efetor composto de aminoácidos D KLAKLAKKLAKLAK (vide, por exemplo, R. Smolarczyk et al., *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009, 63: 360 a 368). Outros peptídeos sintéticos citolíticos bastante conhecidos estão descritos, por exemplo, em Regen et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 566 a 571, 1989.

**[0017]** A destruição da membrana que ocorre após a adesão do peptídeo à membrana pode ocorrer pelo mecanismo de "bastão de cilindro" (modelo de bastão de cilindro), o mecanismo de uma "forma tipo donut" (modelo de poro toroidal) ou um mecanismo de "carpete" (vide por exemplo, R. Smolarczyk et al., *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 360 a 368).

**[0018]** O mecanismo de "bastões de cilindro" é observado para peptídeos afifáticos com conformação alfa-helicoidal

que tem uma extensão de pelo menos 23 aminoácidos. Por exemplo, os peptídeos que causam a destruição da membrana pelo mecanismo de "bastões de cilindro" são gramicidina A, alameticina, perforina, pilosulina, peptídeos sintéticos com notivos de KLA $\bar{K}$  repetidos, catelicidina, peptídeos isolados a partir da destruição da membrana pelo "modelo de poro toroidal", por exemplo, melitina e magainina. Por exemplo, os peptídeos que causam a destruição da membrana pelo modelo de "carpete" são cecropinas A e B.

**[0019]** A desintegração da membrana celular com formação de poros pode ser também causada pela interação de peptídeos de uma alta carga positiva com componentes de membrana de carga negativa. Ditas propriedades mostram, entre outras, granulinas, análogos e derivados de melitina, peptídeos compreendendo motivo K(L)xR, taquiplesina, bombesina, magainina e viscotoxina.

**[0020]** A formação de poros na membrana da célula alvo pode estar também associada com a atividade enzimática de peptídeos. A atividade enzimática de fosfolipase A é mostrada, por exemplo, por fosfolipases com atividade de fosfodiesterase específica contra fosfatidilcolina e esfingomielina, hemolisinas e citolisinas que têm atividade citolítica não específica, ou hemolisinas e citolisinas que têm atividade citolítica contra membranas biológicas que contém, por exemplo, colesterol. Esse tipo de atividade enzimática que resulta na formação de poros na célula ou membrana mitocondrial é exibida por listeriolisina, equinatoxina, fosfolipase PC-PLC e alfa-toxina a partir de *Clostridium perfringens*.

**[0021]** São também conhecidos conjugados e quimeras de peptídeos de formação de poros com domínios capazes de atingir as células tumorais. Para atingir, são utilizadas antígenos, porções de carboidratos ou receptores de fator

de crescimento, superexpressos na superfície de células tumorais. A distribuição alvo provê altos níveis de peptídeos de formação de poros na superfície celular que é necessária para a atividade citolítica.

**[0022]** O uso de actinoporinas de formação de poro alvo está descrito em Panchal RG. et al., Poreforming proteínas and their application in biotechnology. Curr Pharm Biotechnol 2002, 3:99 a 115; Panchal RG: Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer células. Biochem Pharmacol 1998, 55:247 a 252 e em Hoskin DW, Ramamoorthy A: Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta-Biomembr 2008, 1778:357 a 87.

**[0023]** É também conhecido que peptídeos de formação de poros e proteínas podem ser dotados com a habilidade de direcionar os antígenos e receptores associados com tumor por meio de modificação genética adequada bem como por junção química aos ligantes ou anticorpos adequados. Ditas modificações estão descritas para endotoxina d de *Bacillus thuringiensis*, equinatoxina II a partir de *Actinia equina*, esticolisina I de *Stichodactyla helian*Então e toxina de difteria de *Corynebacterium diphtheriae* (Soletti RC., Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteínas in human glioblastoma células. Anti-Cancer Drugs 2008, 19:517 a 525; Pederzolli C,: Biochemical and cytotoxic properties of conjugates of transferrin with equinatoxin-II, a cytolysin a partir de a sea anemone. Bioconjugate Chem 1995, 6:166 a 173, van der Spek JC.: Fusion proteína toxins based on diphtheria toxin: Selective targeting of growth factor receptors of eukaryotic células. Appl Chimeric Genes Hybrid Proteínas Pt B 2000, 327:239 a 249).

**[0024]** Está também descrita uma proteína de fusão que consiste de toxina de esticolisina de formação de poro I e

um anticorpo monoclonal direcionado contra um antígeno específico de tumor C2, e sua utilização no tratamento em um modelo de linha celular de câncer de cólon (Tejuca M et al., Construction of an immunotoxin with the pore forming proteína St1 and/or C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line, *Int. Immunopharmacol.* 2004, 4:731 a 744). Uma série de proteínas de fusão que compreende a toxina de difteria e interleucina-2 ou EGF, e seu potencial para destruir a célula que superexpressa os receptores alvo está descrita também (Murphy JR, van der Spek JC, Targeting diphtheria-toxin to growth-factor receptors, *Semin Cancer Biol* 1995, 6:259 a 267).

**[0025]** É também conhecido o uso de locais de clivagem reconhecidos pelas proteases específicas em moléculas de proteínas de fusão que compreendem os peptídeos citolíticos a fim de permitir a liberação de proteínas efetoras no ambiente tumoral e, conseqüentemente, sua internalização nas células tumorais. Por exemplo, Panchal R. et al. (*Nat Biotechnol* 1996, 14:852 a 856) revelou as alfa-hemolisinas que compreendem na sua sequência um local de clivagem reconhecido pela catepsina B, que é ativada por uma protease presente no ambiente tumoral.

**[0026]** Existe também as proaerolisinas modificadas (PA), precursores inativos de proteínas de formação de poro citolítico bacterial, ativadas quando clivadas por protease de células de câncer de próstata (PSA) (Williams S.A. et al., *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* (2007) 99 (5): 376 a 385).

**[0027]** A US5817771B1 revela conjugados, incluindo proteínas de fusão, de peptídeos citolíticos de formação de poro com um anticorpo ou antígeno como um elemento que se liga seletivamente em uma célula tumoral, e ligantes que permitem a ativação seletiva do peptídeo citolítico no ambiente tumoral, tal como, por exemplo, local de clivagem



reconhecido por enzimas tal como proteases, em particular, proteases superexpressas especificamente no ambiente tumoral.

**[0028]** Barua et al. (Cancer Letters 293 (2010) 240 a 253) relatou que as linhas celulares de câncer de próstata resistentes a TRAIL e insensíveis ao tratamento com anticorpos agonistas receptores de morte DR4 e DR5 se tornaram sensíveis àqueles anticorpos após o pré-tratamento dessas células com KLA de peptídeo lítico anfipático catiônico sintético que contém as sequências de KLA<sup>K</sup>.

**[0029]** A presente invenção provê as proteínas de fusão com as propriedades anti-câncer, que contém um domínio derivado a partir de TRAIL e um domínio de um peptídeo efector citolítico com propriedades de formação de poro contra as membranas mitocondriais e/ou celulares de células de mamíferos.

**[0030]** Cada um dos dois domínios da proteína da invenção tem funções diferentes. Devido à presença de um domínio derivado a partir de hTRAIL, proteínas de acordo com a invenção são direcionadas seletivamente a células de câncer, em que os elementos da proteína exercem seus efeitos. Em particular, o domínio TRAIL após aglutinar com uma célula pode exercer a sua atividade de desencadear a apoptose, e o peptídeo efector a atividade de formar poros na membrana celular e/ou mitocondrial, e causar a lise da célula de câncer.

**[0031]** A distribuição da proteína da invenção no ambiente de tumor permite minimizar a toxicidade e os efeitos colaterais contra as células saudáveis no corpo, bem como a redução da frequência de administração de um medicamento. Além disso, a terapia alvo com o uso de proteínas de acordo com a invenção permite evitar o problema de baixa eficiência de terapias não específicas

conhecidas com base na formação de poros na membrana celular ou mitocondrial com o uso de toxinas de vegetais ou bactérias, causado pela alta toxicidade e pela necessidade de administrar doses altas.

**[0032]** Verificou-se que em muitos casos as proteínas de fusão da invenção são mais potentes do que hTRAIL solúvel e suas variantes incluindo o fragmento de uma sequência.

**[0033]** Até agora, os peptídeos efetores utilizados na proteína de fusão da invenção não foram utilizados em medicina como tal porque as cinéticas desfavoráveis, rápida degradação por proteases não específicas e acúmulo no corpo causado por falta de sequência adequada de ativação de percursos, que é necessária para permitir a ação adequada do peptídeo efector no local alvo. A incorporação dos peptídeos efetores na proteína de fusão permite a sua distribuição seletiva para o local em que a sua ação é desejável. Ademais, a fixação do peptídeo efector aumenta a massa de proteína, que resulta no prolongamento da meia-vida e aumento de retenção de proteína no tumor e a sua eficiência aperfeiçoada.

**[0034]** As proteínas novas de fusão foram também pelo menos reduzidas ou limitadas, ou até mesmo substancialmente eliminaram a atividade hemolítica comparado com os seus peptídeos citolíticos naturais individuais.

**[0035]** Adicionalmente, em muitos casos, as proteínas novas de fusão também superam a resistência natural ou induzida ao TRAIL. Mais provavelmente, superar a resistência é devido à desestabilização da membrana celular potencial como resultado das proteínas de fusão que aglutinam aos lipídeos da membrana celular ou mitocondrial e formação de poros, que causam o vazamento de íons divalentes fora da célula. Como consequência de aglutinação aos lipídios da membrana mitocondrial, ocorre a liberação

de citocromo C, proteína SMAC/Diablo e fator AIF no citoplasma, que causa a ativação de caspase proapoptótica na célula afetada. A degradação das membranas mitocondriais causam também a ativação de caspase-9, que resulta na indução de apoptose.

### **Descrição das Figuras**

**[0036]** A Figura 1 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Cby.Cg-foxn1(nu)/J contaminados com câncer de pulmão A549 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0037]** A Figura 2 apresenta valores de inibição de crescimento do tumor (% de TGI) em camundongos Cby.Cg-foxn1(nu)/J contaminados com câncer de pulmão A549 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0038]** A Figura 3 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de pulmão A549 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0039]** A Figura 4 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de pulmão A549 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0040]** A Figura 5 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos nu Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de pulmão NCI-H460-Luc2 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0041]** A Figura 6 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-

PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de pulmão NCI-H460-Luc2 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0042]** A Figura 7 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Cby.Cg-foxn1(nu)/J contaminados com câncer de próstata PC3 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0043]** A Figura 8 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Cby.Cg-foxn1(nu)/J contaminados com câncer de próstata A549 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0044]** A Figura 9 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de pâncreas PANC-1 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0045]** A Figura 10 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de pâncreas PANC-1 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0046]** A Figura 11 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de cólon HCT116 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0047]** A Figura 12 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de cólon HCT116 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0048]** A Figura 13 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de cólon SW620 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0049]** A Figura 14 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de cólon SW620 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0050]** A Figura 15 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de cólon Colo205 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0051]** A Figura 16 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de cólon Colo205 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0052]** A Figura 17 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com sarcoma uterino MES-SA/Dx5 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0053]** A Figura 18 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com sarcoma uterino MES-SA/Dx5 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0054]** A Figura 19 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com carcinoma pancreático MIA Paca-2 tratados

com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0055]** A Figura 20 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com carcinoma pancreático MIA Paca-2 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0056]** A Figura 21 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de cólon HCT116 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0057]** A Figura 22 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com câncer de cólon HCT116 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0058]** A Figura 23 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com carcinoma hepatocelular HepG2 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0059]** A Figura 24 apresenta valores de inibição de crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com carcinoma hepatocelular HepG2 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281;

**[0060]** A Figura 25 apresenta mudanças do volume do tumor (% de estágio inicial) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com hepatoma PLC/PRF/5 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281; e

**[0061]** A Figura 26 apresenta valores de inibição de

crescimento de tumor (% de TGI) em camundongos Crl:SHO-PrkdcscidHrhr contaminados com hepatoma PLC/PRF/5 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> comparado ao rhTRAIL 114 a 281.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0062]** A invenção está relacionada com uma proteína de fusão compreendendo:

- domínio (a) que é um fragmento funcional da sequência de proteína hTRAIL solúvel, cujo fragmento começa com um aminoácido em uma posição não inferior a hTRAIL 95 e termina com o aminoácido hTRAIL281 ou um homólogo do dito fragmento funcional que tem pelo menos 70% da identidade de sequência, preferencialmente 85% de identidade, e

- pelo menos um domínio (b) que é a sequência de poros de formação de peptídeo efetor citolítico na membrana celular, em que a sequência do domínio (b) está fixada ao terminal C e/ou ao terminal N do domínio (a),

**[0063]** O termo "peptídeo" de acordo com a invenção deve ser entendido como uma molécula construída a partir da pluralidade de amino ácidos aglutinados entre si por meio de uma ligação de peptídeo. Assim, o termo "peptídeo" de acordo com a invenção inclui oligopeptídeos, polipeptídeos e proteínas.

**[0064]** Na presente invenção, as sequências de amino ácidos serão apresentadas de uma maneira convencional adotada na técnica na direção a partir do terminal N (extremidade N) do peptídeo no sentido do seu terminal C (extremidade C). Qualquer sequência terá então o seu terminal N no lado esquerdo e o terminal C no seu lado direito da sua apresentação linear.

**[0065]** O termo "um fragmento solúvel funcional da sequência de proteína solúvel hTRAIL" deve ser entendido como denotando qualquer dito fragmento de proteína hTRAIL

solúvel que seja capaz de induzir o sinal apoptótico em células de mamíferos ao aglutinar os seus receptores na superfície das células.

**[0066]** Deve ser apreciado também por uma pessoa com habilidade na técnica que a existência de pelo menos 70% ou 85% de homologia da sequência de TRAIL é conhecida na técnica.

**[0067]** Deve ser entendido que o domínio (b) do peptídeo efetor na proteína de fusão da invenção não é nem proteína hTRAIL nem uma parte ou um fragmento de proteína hTRAIL.

**[0068]** A proteína de fusão da invenção incorpora pelo menos um domínio (b) do peptídeo efetor, fixado ao terminal C e/ou no terminal N do domínio (a).

**[0069]** Por sequência de hTRAIL, deve ser entendido que a sequência conhecida de hTRAIL publicada na base de dados GenBank sob o número de acesso P505591 bem como na EP0835305A1 e apresentado na Listagem da Sequência da presente invenção como SEQ. N° 90.

**[0070]** Em uma modalidade particular, o domínio (a) é o fragmento da sequência de TRAIL, começando com um amino ácido a partir da faixa de hTRAIL95 até hTRAIL121, including, e começando com o amino ácido TRAIL 281.

**[0071]** Em particular, o domínio (a) pode ser selecionado a partir do grupo que consiste de sequências que correspondem a hTRAIL95 a 281, hTRAIL114 a 281, hTRAIL115 a 281, hTRAIL119 a 281 e hTRAIL121 a 281. Ficará evidente para aqueles com habilidade na técnica que hTRAIL95 a 281, hTRAIL114 a 281, hTRAIL115 a 281, hTRAIL116 a 281, hTRAIL119 a 281 e hTRAIL121 a 281 representa um fragmento de proteína humana TRAIL começando com amino ácido assinalado com os números 95, 114, 115, 116, 119 e 121, respectivamente, e terminando com o último amino ácido 281, na sequência conhecida de TRAIL.



**[0072]** Em outra modalidade particular, o domínio (a) é o homólogo de um fragmento funcional de sequência de proteína TRAIL solúvel começando na posição de amino ácido não inferior a hTRAIL95 e terminando no amino ácido hTRAIL281, a sequência da qual está pelo menos em 70%, preferencialmente em 85%, idêntica à sequência original.

**[0073]** Em variantes específicas dessa modalidade, o domínio (a) é o homólogo de um fragmento selecionado a partir do grupo que consiste de sequências que correspondem ao hTRAIL95 a 281, hTRAIL114 a 281, hTRAIL115 a 281, hTRAIL116 a 281, hTRAIL119 a 281 e hTRAIL121 a 281.

**[0074]** Deve ser entendido que o homólogo de um fragmento de TRAIL é uma variação/modificação da sequência de amino ácido desse fragmento, em que pelo menos um amino ácido é mudado, incluindo 1 aminoácido, 2 aminoácidos, 3 aminoácidos, 4 aminoácidos, 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, e não mais de 15% de amino ácidos, e em que o fragmento de uma sequência modificada preservou a funcionalidade da sequência de TRAIL, ou seja, a habilidade de aglutinar à receptores de morte de superfície celular e induzir apoptose em células de mamíferos. A modificação da sequência de amino ácido pode incluir, por exemplo, substituição, exclusão e/ou adição de amino ácidos.

**[0075]** Preferencialmente, o homólogo de fragmento de TRAIL que tem sequência modificada mostra afinidade modificada aos receptores de morte DR4 (TRAIL-R1) ou DR5 (TRAIL-R2) em comparação com o fragmento nativo de TRAIL.

**[0076]** O termo "afinidade modificada" se refere à afinidade aumentada e/ou à afinidade com seletividade de receptor alterada.

**[0077]** Preferencialmente, o homólogo do fragmento de TRAIL que tem sequência modificada aumentou a afinidade com os receptores de morte DR4 e DR5 comparado com o fragmento

nativo de TRAIL.

**[0078]** Particularmente preferível, o homólogo de um fragmento de TRAIL que tem sequência modificada mostra afinidade aumentada com o receptor de morte DR5 em comparação com o receptor de morte DR4, ou seja, seletividade aumentada de DR5/DR4.

**[0079]** Também preferencialmente, o homólogo de um fragmento de TRAIL que tem sequência modificada mostra uma seletividade aumentada no sentido dos receptores de morte DR4 e/ou DR5 em relação à afinidade no sentido dos receptores DR1 (TRAIL-R3) e/ou DR2 (TRAIL-R4).

**[0080]** As modificações de TRAIL que resultam no aumento de afinidade e/ou de seletividade no sentido dos receptores de morte DR4 e DR5 são conhecidos por aqueles com habilidade na técnica. Por exemplo, Tur V, van der Sloot AM, Reis CR, Szegezdi E, Cool RH, Samali A, Serrano L, Quax WJ. As variantes de ligando que induzem apoptose relacionada com fator de necrose de tumor seletivo DR4 (TRAIL) obtida por projeto baseado em estrutura. J. Biol. Chem. 2008 Jul 18;283(29):20560 a 8, descreve a mutação de D218H que tem seletividade aumentada no sentido da DR4, ed Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Yagolovich AV, Popova EN, Sycheva AM, Moshkovskii SA, Kirpichnikov MP. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, Apoptosis. 2009 Jun;14(6):778 a 87, descreve a mutação de D269H que tem afinidade reduzida no sentido da DR4. Mutantes de hTRAIL que resultam na afinidade aumentada no sentido de um receptor selecionado a partir de DR4 e DR5 comparado com os receptores de DR1 e DR2 e afinidade aumentada no sentido do receptor DR5 comparado com DR4 estão descritos também em WO2009077857 e WO2009066174.

**[0081]** As mutações adequadas são uma ou mais mutações nas posições de hTRAIL nativo selecionado a partir do grupo que consiste de amino ácidos 131, 149, 159, 193, 199, 201, 204, 204, 212, 215, 218 e 251, em particular mutações que envolvem a substituição de um amino ácido por um amino ácido básico tal como lisina, histidina ou arginina, ou um amino ácido ácido tal como ácido glutâmico ou ácido aspárgico. Em particular, uma ou mais mutações selecionadas a partir do grupo que consiste de G131R, G131K, R149I, R149M, R149N, R149K, S159R, Q193H, Q193K, N199H, N199R, K201H, K201R, K204E, K204D, K204L, K204Y, K212R, S215E, S215H, S215K, S215D, D218Y, D218H, K251D, K251E e K251Q, conforme descrito no WO2009066174, pode ser mencionado.

**[0082]** As mutações adequadas são também uma ou mais mutações nas posições de hTRAIL nativo selecionado a partir do grupo que consiste de amino ácidos 195, 269 e 214, particularmente mutações que envolve substituição de um amino ácido com um amino ácido básico tal como lisina, histidina ou arginina. Em particular, uma ou mais mutações selecionadas a partir do grupo que consiste de D269H, E195R e T214R, conforme descrito em WO2009077857, pode ser mencionado.

**[0083]** Em uma modalidade particular, o domínio (a) que é o homólogo de um fragmento de hTRAIL, é selecionado a partir do mutante D218H da sequência de TRAIL nativo, conforme descrito em WO2009066174, ou o mutante Y189N-R191K-Q193R-H264R-I266R-D269H da sequência de TRAIL nativo, conforme descrito em Gasparian ME et al. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, Apoptosis. 2009 Jun; 14(6): 778 a 87.

**[0084]** O domínio (a), ou seja, o fragmento de TRAIL, é um domínio responsável por aglutinar a construção da proteína de fusão aos receptores de morte na superfície de uma célula. Ademais, o domínio (a) ao ligar irá exercer a sua atividade agonística conhecida, ou seja, ativação de

percurso extrínscico de apoptose.

**[0085]** O domínio (b) da proteína de fusão da invenção é o domínio de um peptídeo efetor com atividade citolítica contra célula eucariótica.

**[0086]** Em modalidades particulares da proteína de fusão da invenção, o peptídeo efetor de domínio (b) da proteína de fusão é um peptídeo que tem a atividade de formação de poro contra células cancerígenas, selecionadas a partir do grupo que consiste de SEQ. N° 34 até SEQ. N° 56, e SEQ. N° 125 até SEQ. N° 132.

**[0087]** Para o peptídeo com atividade citolítica, é pretendido um peptídeo que tem a habilidade de formar poros na membrana celular, e após a penetração na célula, também na membrana mitocondrial, perturbando dessa maneira a continuidade da membrana. Como resultado da interrupção da membrana, ocorre um vazamento dos conteúdos do citoplasma, incluindo íons, fora da célula, que causa o desequilíbrio de eletrólito irreversível e rápido na célula, e sua destruição (lise celular).

**[0088]** A habilidade de um peptídeo para formar poros na membrana celular ou mitocondrial e então causar a lise celular a pode ser determinado por um método de testar a permeabilização de membranas celulares conhecidos por aqueles com conhecimento na técnica, por exemplo, medindo a liberação a partir da célula de substâncias intracelulares que previamente havia sido aplicada à técnica, por exemplo, de ATP ou marcador rotulado por radio, ou medindo a ingestão de uma matriz, tal como azul de tripano, que não ocorre quando as células estão intactas.

**[0089]** O peptídeo efetor de citolítico da invenção pode tanto ser um peptídeo natural quanto um peptídeo sintético.

**[0090]** Peptídeo de formação de poro citolítico natural pode ser exotoxina bacteriana tal como alfa-HL, aerolisina,

perfringolisina, pneumolisina, estreptolisina O, listeriolisina, toxina de *Bacillus thuringensis*, parasporina de *Bacillus thuringensis*, moléculas líticas a partir de *E.coli* tal como hemolisina ou colicina.

**[0091]** O peptídeo de formação de poro citolítico natural pode ser também um peptídeo eucariótico tal como granulicina humano, família de pilosulina, incluindo pilosulina 1 e pilosulina 5 a partir de veneno das formigas Australianas *Myrmecia Pilosula*, magainina tal como magainina-2 a partir da pele de sapo Africano *Xenopus laevis*, aureina 1.2 a partir da pele de sapo Africano *Litoria raniformis*, citropina 1.1 a partir da pele de três sapos *Litoria citropa*, melitina a partir do veneno da abelha *Apis mellifera*, defensinas, tal como alfa-defensina e beta-defensina isolado a partir das células humanas, lactoferricinas, tal como lactoferricina B a partir do leite da vaca, taquiplesina a partir de leucócitos do caranguejo *Tachypleus tridentatus*, cecropinas A e B, ou pleurocidinas isolado a partir de *Pleuronectes americanus*.

**[0092]** A peptídeo de formação de poro citolítico sintético pode ser conhecida peptídeo citolítico conhecido tal como o híbrido de fragmento de cecropina A e fragmento de magainina 2 CA(1-8)MA(1-12), o híbrido de fragmento de cecropina A e fragmento de CAMEL (CA(1-7)MEL(2-9)) de melitina, peptídeos citolíticos sintéticos que consistem de lisina, arginina e leucina de aminoácidos de carga positiva, a parte da qual que estão na forma de aminoácidos D tal como D-K<sub>4</sub>-L<sub>2</sub>-R<sub>9</sub> e D-K<sub>6</sub>-L<sub>9</sub>, e peptídeos que contêm domínio composto por KLAKLAK de motivo de aminoácido D ou repetições desses, por exemplo (KLAKLAK)<sub>2</sub>, peptídeos híbridos sintéticos de dois peptídeos líticos tal como magainina-bombesina híbridos e cecropina-melitina, peptídeos de fusão sintéticos que contêm o peptídeo

citolítico sintético e domínio que se aglutina ao receptor presente na superfície celular ao invés de receptor TRAIL ou domínio que permite a penetração na célula, ou peptídeos líticos com base em modelo hélico anfipático que consiste de séries KLLK e KLLK ou peptídeos modificados e/ou truncados (preferencialmente na forma de fusões com domínios de transdução ou de alvo) de origem de mamíferos.

**[0093]** O peptídeo efetor de domínio (b) da proteína de fusão da invenção pode ser um peptídeo que forma poros na membrana celular ou mitocondrial por interações diretas dos peptídeos que têm alta carga positiva com membrana de carga negativa.

**[0094]** As sequências exemplificativas do peptídeo efetor nessa modalidade são designados como SEQ. N° 34 (uma forma ativa de granulicina humana), SEQ. N° 35 (peptídeo lítico sintético com 15 amino ácidos), SEQ. N° 38 (peptídeo a partir de taquiplesina), SEQ. N° 39 (bombesina-magainina de peptídeo de fusão 2), SEQ. N° 40 (magainina-2), SEQ. N° 42 (cecropina-melitina de peptídeo híbrido de com amino ácidos), SEQ. N° 53 (viscotoxina A3 (VtA3)), e SEQ. N° 56 (peptídeo de fusão compreendendo um inibidor de EGF e peptídeo lítico sintético), SEQ. N° 132 (melitina), SEQ. N° 129 e SEQ. N° 131 (peptídeo de fusão compreendendo versões de bombesina e truncadas de BMAP27 (B27) ou BMAP28 (B28), SEQ. N° 130 (peptídeo sintético com 17 amino ácidos).

**[0095]** O peptídeo efetor de domínio (b) da proteína de fusão da invenção pode ser um peptídeo que forma poros que tem conformação de alfa-hélices anfifáticas que permitem interações com membranas biológicas.

**[0096]** As sequências exemplificativas do peptídeo efetor nessa modalidade são designadas como SEQ. N° 36 (pilosulina-1), SEQ. N° 37 (pilosulina-5), SEQ. N° 41 (peptídeo lítico sintético com 14 amino ácidos), SEQ. N° 43

(peptídeo com 27 amino ácidos FF/CAP-18), SEQ. N° 44 (peptídeo BAMP-28), SEQ. N° 45 (o análogo de isoforma C de peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica*), SEQ. N° 46 (o análogo de isoforma A de peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica*), SEQ. N° 47 (o análogo de isoforma B de peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica*), SEQ. N° 48 (o fragmento de domínio HA2 de hemaglutinina do vírus da influenza), SEQ. N° 54 (o fragmento ativo de perforina humana), SEQ. N° 55 (parasporina-2 a partir de *Bacillus thuringensis*), SEQ. N° 125 (peptídeo de fusão sintético com motivo KLLK), SEQ. N° 126, e SEQ. N° 127 (análogos de pleurocidina), SEQ. N° 128 (peptídeo sintético com motivo KLLK).

**[0097]** O peptídeo efetor de domínio (b) da proteína de fusão da invenção pode ser um peptídeo de formação de poro com atividade enzimática selecionado a partir do grupo de fosfolipases, hemolisinas ou citolisinas. As sequências exemplificativas do peptídeo efetor nessa modalidade são designados como SEQ. N° 49 (domínio do terminal N de alfa-toxina a partir de *Clostridium perfringens* com atividade de fosfolipase C), SEQ. N° 50 (Listeriolisina O), SEQ. N° 51 (fosfolipase PC-PLC), e SEQ. N° 52 (equinatoxina EqTx-II).

**[0098]** O peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra célula eucariótica pode ser um peptídeo que seja uma forma ativa de granulicina humana, que pertença à família do tipo saponina, que exiba forte habilidade de aglutinação aos lipídios de membrana (P. M. Lydyard, A. Whelan, M. W. Fanger, "Krótkie wykłady: Immunologia", Wydawnictwo Naukowe PWN 2001). Devido à habilidade de aglutinação às membranas, a granulicina é capaz de degradar as membranas mitocondriais. Esse processo causa a liberação para dentro do citoplasma de citocroma C, proteína SMAC/Diablo e o fator AIF, que causa a ativação de

cascata apoptótica e ativação de caspase-9, que também resulta na indução de apoptose. A granulicina também ativa as preteínas Bid para formar tBid, que está diretamente envolvida na formação de poros nas membranas da mitocôndria (Zhang et al, The Journal of Immunology, 182: 6993 a 7000, 2009).

**[0099]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 83 amino ácidos apresentados na listagem da sequência anexa como SEQ. N° 34.

**[00100]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de pré-formação contra a célula eucariótica pode ser um peptídeo citolítico sintético composto de leucina (L) e lisina (K) e que se assemelham estruturalmente aos peptídeos líticos naturais a partir de veneno de abelha ou um peptídeo a partir de *Ameba histolitica* (Makovitzki, A., Suppression of Human Solid Tumor Growth in Mice by Intratumor and Systemic Inoculation of Histidine-Rich and pH-Dependent Host Defense-like Lytic Peptides, cancer Research, 2009). Devido ao alto conteúdo dos ditos amino ácidos o peptídeo tem forte carga positiva que permite a sua interação seletiva com membranas de células transformadas em tumor e penetração na sua estrutura com a formação de poros de acordo com o mecanismo de "bastões de cilindro".

**[00101]** Em particular, um dito peptídeo efetor é peptídeo com 15 amino ácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 35.

**[00102]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poros contra a célula eucariótica pode ser uma pilosulina de peptídeo 1, que é uma molécula catiônica derivada de veneno da formiga Australiana *Myrmecia Pilosula*. A pilosulina 1 é um peptídeo com alto conteúdo de lisina e arginina repetido regularmente em uma



sequência. Devido ao alto conteúdo desses amino ácidos, o peptídeo tem uma forte carga positiva que permite a sua interação seletiva com membranas de células cancerígenas e formação de poros através do mecanismo de "bastões de cilindro" (Kourie et al., Am J Physiol Cell Physiol, 278: 1063 a 1087, 2000).

**[00103]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 56 aminoácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 36.

**[00104]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poros contra a célula eucariótica pode ser uma pilosulina de peptídeo 5, responsável por interações iônicas com a membrana celular que resulta na formação de poros, e como consequência a inibição do crescimento do tumor. A pilosulina 5 é o peptídeo que pertence a família de pilosulinas derivadas do veneno da formiga Australiana *Myrmecia Pilosula*. Esse peptídeo tem na sua estrutura o padrão repetido ciclicamente de lisina de amino ácidos, alanina, e ácido aspártico, transmitindo uma carga positiva, que pode potencializar interações com superfície de células de tumor.

**[00105]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 100 aminoácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 37.

**[00106]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poros contra a célula eucariótica pode ser uma taquiplesina, peptídeo catiônico isolado a partir de leucócitos de caramujejo *Tridentatus Tachypleus*. Após a penetração dentro das células eucarióticas, a taquiplesina exibe alta afinidade com as membranas mitocondriais e causa sua desestabilização através do mecanismo de "bastões de cilindro" e vazamento a partir da mitocôndria no citoplasma de fatores tal como citocroma C,

proteína SMAC/DIABLO e fator AIF, que causa a morte celular (Chen, Y., et al., *RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth*. Cancer Res, 2001. 61(6): p. 2434 a 2438; Ouyang, G.L., et al., *Effects of tachyplesin on proliferation and differentiation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 células*. World J Gastroenterol, 2002. 8(6): p. 1053 a 1058.).

**[00107]** Em particular, um dito peptídeo efetor é peptídeo com 17 aminoácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 38.

**[00108]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) pode ser uma bombesina-magainina de peptídeo de fusão com atividade citolítica contra a célula eucariótica.

**[00109]** A família de magaininas consiste de polipeptídeos com 21 a 27 amino ácidos isolados a partir da pele do sapo Africano *Xenopus laevis*. A estrutura alfa-helicoidal anfifática dos peptídeos permite que os mesmos formem poros na membrana celular através do mecanismo de "bastão de cilindro" (Matsuzaki et al, Biochim Biophys Acta, 1327:119 a 130, 1997). Bombesina, um peptídeo com 14 amino ácidos com alta carga positiva isolada a partir da pele de sapos, pertence ao grupo de peptídeos que abriga tumor, e como tal, exhibe alta afinidade com a superfície de alguns tipos de tumores sólidos e cânceres de sangue, que são caracterizados por uma forte carga negativa da membrana celular (Moody et al., Peptides, 1983; volume 4: 683 a 686). Bombesina é capaz de se aglutinar aos receptores celulares para neuromedina B, um homólogo próximo de bombesina que existe no corpo humano, que estão altamente expressos na superfície de células tumorais. Isso aumenta significativamente o nível de especificidade de bombesina e de seu acúmulo nos tecidos ocupados pelo tumor, enquanto minimiza a toxicidade sistêmica. Os conjugados de peptídeos

tóxicos com bombesina exibem atividade aperfeiçoada antitumoral comparado com as proteínas individuais (Huawei et al., Mol. Pharmaceutics, 2010;2:586 a 596). Magainina é caracterizada por propriedades de aglutinação limitadas aos receptores de células tumorais e conseqüentemente a sua citotoxicidade é manifestada somente em altas concentrações. Foi demonstrado que o peptídeo de fusão compreendendo magainina e bombesina permite aumentar a especificidade e citotoxicidade contra células tumorais (Liu S. et al., Enhancement of cytotoxicity of antimicrobial peptide magainin II in tumor células by bombesin-targeted delivery. Acta Pharmacol Sin. 2011 Jan;32(1):79 a 88).

**[00110]** Em particular, um dito peptídeo efetor é peptídeo com 40 aminoácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 39.

**[00111]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) pode ser também um peptídeo de fusão compreendendo bombesina e versões truncadas de BMAP27 (B27) ou BMAP28 (B28) com atividade citolítica contra célula eucariótica. Dito peptídeo quimérico revela atividade citotóxica e reduzida toxicidade sistêmica (Cai H. et al., Selective apoptotic killing of solid and hematologic tumor células by bombesin-targeted delivery of mitochondria-disrupting peptides, Mol. Pharmaceutics, 2010, 7(2), pp. 586 a 596).

**[00112]** Em particular, ditos peptídeos efetores são peptídeos com 31 aminoácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 129 e peptídeo com 29 aminoácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 131.

**[00113]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) pode ser peptídeo de magainina 2 com atividade citolítica contra célula eucariótica, formando poros na célula e membrana

mitocondrial. Em particular, um dito peptídeo efetor é peptídeo com 23 aminoácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 40.

**[00114]** Outro peptídeo efetor citolítico de domínio (b) com atividade contra célula eucariótica pode ser um peptídeo lítico sintético. Os peptídeos sintéticos da fórmula (KLAKKLA)<sub>n</sub> (em que n é uma série de repetições do motivo) como proteínas anfifáticas e alfa-helicoidais após penetração na célula são seletivamente acumulados na membrana mitocondrial negativamente carregada, causando a formação de poros e desestabilização de potencial eletrostático de mitocôndria, desta forma eliminando células seletivamente de linhas celulares de câncer selecionados (*Javadpour et al*, J Med Chem, 39:3107 a 3113, 1996).

**[00115]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 14 aminoácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 41.

**[00116]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade citolítica contra célula eucariótica pode ser um outro peptídeo lítico sintético que desintegra a membrana celular de uma maneira tipo detergente. (Papo N, Shai Y. New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor células comparado com normal células. Biochemistry. 2003 Aug 12;42(31):9346 a 9354).

**[00117]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 17 aminoácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 128.

**[00118]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade citolítica contra célula eucariótica pode ser peptídeo híbrido de cecropina-melitina, que causa a formação de poros na membrana celular e consequentemente causa a inibição do crescimento tumoral. A cecropina A

contém na sua estrutura uma grande quantidade de amino ácidos com carga positiva tal como lisina, leucina e alanina (Quellette, A., J., e Selsted, M., E., 1996, FASEB. J., 10(11), 1280 a 1289), devido ao que forma poros na membrana de células eucarióticas. Além disso, cecropina A tem atividade tóxica, destruindo a estrutura do citoesqueleto celular desestabilizando a estrutura de microtúbulos (Jaynes, J. et al., 1989, Peptide Res., 2 (2), 157 a 160).

**[00119]** A metilina é um peptídeo construído com 25 amino ácidos, que tem alta carga positiva e estrutura alfa-helicoidal, e desta forma interage fortemente com as membranas de células tumorais e formam poros pelo mecanismo de "bastão de cilindro" (Smolarczyk, R. et al Peptydy - nowa klasa leków przeciwnowotworowych, Postępy Hig and Med. Doświadczalnej, 2009, 63: 360 a 368). Adicionalmente, a melitina estimula a fosfolipase de enzima de membrana A2, responsável pela decomposição de fosfolipídios de membrana, que resulta na liberação de ácidos graxos que são componentes da bicamada de lipídio da membrana celular. A cecropina A/metilina de peptídeo quimérico sintético obtida a partir da fusão genética de terminal N de carga positiva de peptídeo de cecropina com terminal N hidrofóbico de peptídeo de melitina exibe maior atividade citotóxica contra células alvo e é desprovido de característica de atividade hemolítica para cecropina e melitina (Boman, H., G. et al (1989) FEBS Lett 259, 103 a 106; Andreu, D. et al (1992) FEBS Lett. 296, 190 a 194).

**[00120]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 26 amino ácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 42.

**[00121]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro é o peptídeo FF/CAP18

descrito por Isogai E. em "Antimicrobial and Lipopolysaccharide-Binding Activities of C-Terminal Domain of Human CAP18 Peptides to Genus *Leptospira*", The Journal of Applied Research, Vol. 4, No. 1, 2004, 180 a 185). A FF/CAP18 é o análogo de sequência de terminal C com 27 amino ácidos de catelicidina humana hCAP18<sub>109</sub> a <sub>135</sub>, que foi modificado pela reposição de resíduos de 2 amino ácidos com fenilalaninas. FF/CAP18 tem forte caráter catiônico, aumentado em relação à sequência nativa devido à modificação incorporada, e fortemente se aglutina às membranas celulares eucarióticas. Uma vez aglutinado à superfície da membrana, o FF/CAP18 forma canais e poros iônicos, causando a desestabilização do equilíbrio eletrostático de células. Além disso, após a penetração dentro da célula, o análogo constrói dentro da membrana mitocondrial para formar canais de íons, desta forma desestabilizando o potencial eletrostático de mitocôndria e causando a liberação a partir da mitocôndria até os fatores de citosol tal como citocroma C, SMAC/Diablo ou fator de AIF, que inicia o processo de apoptose.

**[00122]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 27 aminoácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 43.

**[00123]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poros é um peptídeo BAMP-28 com forte carga positiva que pertence à família de catelicidinas. Esse peptídeo é também o análogo estrutural de histatinas humanas, um grupo de 12 peptídeos com uma massa abaixo de 4 kDa produzido por células de glândulas salivares e que exhibe propriedades antibacterianas e antifúngicas (W. Kamysz et al., Histatyny - białka liniowe bogate w histydyne, Nowa Stomatologia 2004). O domínio de terminal N de peptídeo BAMP-28 tem forte carga positiva e é

responsável por ancorar a membrana celular, ao passo que a parte do terminal C é responsável pela atividade citotóxica. (Hugosson, M., D. et al., 1994). Antibacterial peptides and mitochondrial presequences affect mitochondrial coupling, respiration and proteína import. Eur. J. Biochem. 223:1027 a 1033.). O mecanismo de atividade de peptídeo BMAP-28 está principalmente baseado na formação de poros na célula e nas membranas mitocondriais (A. Risso et al., BMAP-28, an Antibiotic Peptide of Innate Immunity, Induces Cell Death through Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Mar. 2002, p. 1926 a 1935).

**[00124]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 27 amino ácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 44.

**[00125]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro é o análogo de isoforma A de peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica* responsável pelo acúmulo na superfície celular resultando na formação de poros, que consequentemente causa a inibição de crescimento tumoral. Três isoformas A, B e C dos peptídeos de *Entamoeba histolytica* foram identificados, localizados no citoplasma granular do parasita. Esses são polipeptídeos com 77 aminoácidos estabilizado por três pontes de sulfeto, contendo na segunda estrutura quatro hélices anfifáticas (Leippe, M et al EMBO J. 11, 3501 a 3506, 1992). Esses peptídeos têm propriedades líticas contra células eucaróticas (Leippe, M. e Müller-Eberhard, H.J. Toxicology 87, 5 a 18, 1994). A terceira hélice na estrutura desses peptídeos tem uma extensão adequada para penetração da membrana celular e formação de poros. Com base nas sequências de amino ácidos compreendendo somente o terceiro domínio de hélice de todas as três isoformas, uma

série de peptídeos sintéticos análogos (A3, B3, e C3) foi construída tendo a atividade de formação de poro e citotóxica contra as linhas celulares de câncer humano e caracterizado com baixa atividade hemolítica (Andrä et al., FEBS Letters 385: 96 a 100,1996).

**[00126]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 24 aminoácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 45.

**[00127]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra célula eucariótica é um análogo de isoforma B de peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica*.

**[00128]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 24 aminoácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 46.

**[00129]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra célula eucariótica é um análogo de isoforma C de peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica*.

**[00130]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 24 aminoácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 47.

**[00131]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra célula eucariótica é um homólogo de fragmento de terminal N com 20 aminoácidos, tão chamada "peptídeo de fusão", de domínio HA2 de hemaglutinina de vírus influenza, responsável pela interação de capsídeo viral com membrana celular hospedeiro (intercalação) que resulta na formação de poros na membrana celular do hospedeiro. Hemaglutinina (HA) de vírus influenza é uma glicoproteína homotrimérico responsável pela fusão de capsídeo viral com membrana celular hospedeira. Dois domínios podem ser distinguidos na



estrutura da proteína, o HA1 responsável pela aglutinação do receptor e H2 responsável pelas interações com a membrana celular. Na estrutura de domínio HA2 somente parte terminal N (20 amino ácidos), tão chamados "peptídeo de fusão", diretamente intercala na estrutura da membrana celular (Dürren P et. al., J Biol Chem 271:13417-13421, 1996). A análise estrutural de homólogos de peptídeo de fusão mostrou que sua atividade é associada com a mudança de conformação causando a formação de alfa hélices anfifáticas, que são capazes de perfuração de membrana endosoma (Takahashi S., Biochemistry 29: 6257 a 6264, 1990). Portanto, derivados de "peptídeo de fusão" pode ser utilizado como portadores eficazes de substância ativa biologicamente provendo um "escape" eficiente e rápido a partir dos endosomas.

**[00132]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 12 aminoácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 48.

**[00133]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra célula eucariótica é domínio terminal N de alfa toxina a partir de *Clostridium perfringens* atividade de fosfolipase C contra fosfatidilcolina e esfingomiélin a partir de membranas celulares, permitindo a formação de poros. O domínio de terminal N da alfa-toxina de *Clostridium perfringens* inclui o centro ativo de fosfolipase C.

**[00134]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 247 amino ácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 49.

**[00135]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra a célula eucariótica é um fragmento de listeriolisina O, um peptídeo de formação de poro dependente de colesterol que pertence ao grupo de

hemolisinas secretadas por patógeno e ativada após acidificação do ambiente de endosoma (*Schnupf P, Portnoy DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. Microbes Infect. 2007 Aug; 9(10): 1176 a 1187. Epub 2007 May 7*). Foi mostrado que a listeriolisina O na forma de uma proteína de fusão com proteína alvo pode eliminar especificamente as células tumorais (*Bergelt S, Frost S, Lilie H. Listeriolysin O as cytotoxic component of an immunotoxin. Proteína Sci. 2009 Jun;18(6):1210 a 20*).

**[00136]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 468 amino ácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 50.

**[00137]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra a célula eucariótica é um fragmento ativo de fosfolipase PC-PLC. A fosfolipase PC-PLC é responsável pela lise eficiente de vacúolos em células endoteliais primárias e age sinergisticamente com listeriolisina na lise de vacúolo primário e secundário. Um substrato para PC-PLC é fosfatidilcolina (*Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of Listeria monocytogenes have overlapping roles in escape a partir de a vacuole and cell-to-cell spread. Infect Immun. 1995 Nov;63(11):4231 a 4237*).

**[00138]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 288 aminoácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 51.

**[00139]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra a célula eucariótica é uma proteína de equinatoxina. A equinatoxina EqTx-II é uma citolisina de formação de poro isolada a partir de anemona *Actinia equina*, caracterizada por uma alta toxicidade não específica com relação às células de mamíferos.

**[00140]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um

peptídeo com 179 aminoácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 52.

**[00141]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra a célula eucariótica é viscotoxina A3 (VtA3). A viscotoxina A3 é uma das tioninas a partir de visco (*Viscum album*). Estruturalmente, ela consiste de uma cadeia de 46 amino ácidos com três pontes de dissulfeto típicas para a família (Coulon A. et al., Comparative membrane interaction study of viscotoxins A3, A2 and B a partir de mistletoe (*Viscum album*) and connections with their structures. *Biochem J.* 2003 Aug 15;374(Pt 1):71 a 78). As propriedades tóxicas de viscotoxina em linhas de células cancerígenas são conhecidas (Tabiasco J. et al *Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. Eur J Biochem.* 2002 May;269(10):2591 a 2600). O mecanismo molecular exato de ação não foi descrito para VtA3. É conhecido, entretanto, que ele envolve a formação de canais de íons e dano de estruturas de membrana por permeabilização. Uma forte carga positiva da molécula favorece aglutinar tanto os ácidos nucleicos quanto os fosfolipídios (Giudici M, Pascual R, de la Canal L, Pfüller K, Pfüller U, Villalaín J. *Interaction of viscotoxins A3 and B with membrane model systems: implications to their mechanism of action. Biophys J.* 2003 Aug;85 (2):971 a 981).

**[00142]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 46 amino ácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 53.

**[00143]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra a célula eucariótica é um peptídeo que é um fragmento ativo de perforina humana. O uso de proteínas de origem humana que são "invisíveis" ao sistema imunológico, incluindo perforina humana, pode

resolver o problema de utilidade clínica limitada de quimeras de proteínas contendo toxinas de origem bacteriana, animal ou vegetal, devido à forte imunogenicidade gerada (Frankel AE. Reducing the immune response to immunotoxin. Clin Cancer Res. 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):13 a 15). O fragmento do terminal N com 34 amino ácidos de perforina humana que forma poros não especificamente na membrana celular retém a atividade citotóxica seletiva da proteína integral (Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. Immunol Today.1995 Apr;16(4):194 a 201). Um fragmento de perforina fundido em um anticorpo que tem como alvo células cancerígenas retém a atividade citotóxica seletiva da proteína integral (Wan L. Expression, purification, and refolding of a novel immunotoxin containing humanized single-chain fragment variable antibody against CTLA4 and the N-terminal fragment of human perforin. Proteína Expr. Purif. 2006 Aug;48(2):307 a 313. Epub 2006 Mar 9).

**[00144]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 33 amino ácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 54.

**[00145]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra a célula eucariótica é parasporina-2 a partir do *Bacillus thuringensis*. A família de parasporinas compreende 13 diferentes toxinas que pertencem aos subgrupos PS1, PS2- PS3, PS4 (Ohba M. Parasporin, a new anticancer proteína group a partir de *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Res. 2009 Jan;29(1):427 a 433). A parasporina-2 exerce a especificidade contra células de câncer (MOLT-4, Jurkat, HL60, HepG2, CACO-2) e existe em uma forma de protoxina 37-kDa ativada cortando pela proteínaase K uma parte de fragmentos de terminal N e C de respectivamente 51 e 36 amino ácidos. A ação principal

de parasporina-2 consiste de oligomerização dentro da membrana celular a fim de formar poros que têm um diâmetro de cerca de 3 nm, que resulta no aumento de sua permeabilidade. Os efeitos da atividade de parasporina-2 depende do tipo de linhas celulares testadas e incluem a formação dos tão chamados "bolhas" ou saliências causadas pela vazão do citoplasma a partir das células e suas lises (células HepG2 e NIH-3T3) ou formação de estruturas tipo vacúolo que resultam na explosão de células (MOLT-4) (Kitada S. Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin a partir de *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 2006 Sep 8;281(36):26350 a 26360). Além disso, a atividade de parasporina-2 causa a destruição da estrutura de microtúbulos, emaranhamento de filamentos de actina, fragmentação de mitocôndria e do retículo endoplasmático (Akiba T. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. J. Mol. Biol. 2009 Feb 13;386(1):121 a 133).

**[00146]** Em particular, um dito peptídeo efector é um peptídeo com 251 amino ácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 55.

**[00147]** Outro peptídeo efector de domínio (b) com atividade de formação de poro contra a célula eucariótica é uma proteína de fusão compreendendo peptídeo lítico sintético e inibidor de peptídeo do receptor de EGF na superfície celular. A aglutinação de um inibidor de EGFR sobre a superfície celular permite a localização do peptídeo lítico à superfície celular, e inibe adicionalmente a quinase de tirosina de receptor intracelularmente localizada. A inibição de atividade de quinase resulta na falta de cascata de sinais bioquímicos que causam a liberação de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmáticos e para a ativação de RAS que sinaliza o percurso que causa o

aumento de atividade de percursos de glicólise, síntese de proteína e depois causa a redução de proliferação celular e limitada progressão de tumor (Carpenter G, Cohen S., (Maio 1990). "Epidermal growth factor". The Journal of Biological Chemistry 265 (14): 7709 a 7712). Os peptídeos sintéticos compreendendo resíduos de leucina e de lisina repetidos na medida em que as proteínas anfifáticas e helicoidais eliminam seletivamente as linhas celulares de câncer selecionadas (Javadpour et al., J. Med. Chem., 39:3107 a 3113, 1996).

**[00148]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 32 amino ácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 56.

**[00149]** O peptídeo de fusão apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 56, compreendendo um inibidor de EGF e peptídeo lítico sintético, é novo e não foi descrito antes.

**[00150]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra célula eucariótica é uma proteína de fusão compreendendo peptídeo lítico sintético com motivo KLLK e um peptídeo sendo antagonista de receptor de PDGF na superfície celular. A aglutinação de um inibidor de PDGF na superfície celular permite a localização do peptídeo lítico até a superfície celular, e adicionalmente a aglutinação afeta a proliferação celular e a angiogênese (Ostman A. et al., PDGF Receptors as Targets in Tumor Treatment, Adv. Cancer Res., 2007;97:247 a 274.)

**[00151]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 39 amino ácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 125.

**[00152]** O peptídeo de fusão apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ. N° 125 e uma variante de fusão de antagonista de PDGF e peptídeo lítico sintético da SEQ. N°

125 é novo e não foi descrito antes.

**[00153]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra célula eucariótica é uma proteína sendo análoga de pleurocidina. As pleurocidades são proteínas  $\alpha$ -helicoidais catiônicas que interagem com a membrana celular (Cole AM et al., *Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. J Biol Chem.* 1997 May 2;272(18):12008 a 12013). Os peptídeos tipo pleurocidina são ativos contra células de carcinoma de mama, incluindo células de câncer de mama resistentes a droga e de crescimento lento. (Hilchie AL et al., *Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenotransplants. Breast Cancer Res.* 2011 Oct 24;13(5):R102).

**[00154]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 25 amino ácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 126 e peptídeo com 26 amino ácidos apresentados na listagem de sequência anexa como SEQ. 127.

**[00155]** Outro peptídeo efetor de domínio (b) com atividade de formação de poro contra célula eucariótica é um peptídeo B27 - uma versão truncada de células mielóides bovina de forma isolada de proteína BMAP27 que pertence à família de catelicidina. (Donati M. et al., *Activity of Cathelicidin Peptides against Chlamydia spp., Antimicrob Agents Chemother.* 2005 March; 49(3): 1201 a 1202).

**[00156]** Em particular, um dito peptídeo efetor é um peptídeo com 25 amino ácidos apresentado na listagem de sequência anexa como SEQ No. 130.

**[00157]** Ao aglutinar aos receptores de TRAIL presentes na superfície de células cancerígenas, a proteína de fusão

irá exercer um duplo efeito. O domínio (a), que é um fragmento funcional de TRAIL ou seu homólogo com funcionalidade preservada, irá exercer sua conhecida atividade agonística, ou seja, aglutinar aos receptores de morte na superfície celular e ativação de percurso extrínscio de apoptose. O peptídeo efetor do domínio (b) da proteína de fusão será capaz de exercer potencialmente a sua ação extracelular ou intracelularmente em paralelo à atividade de domínio de TRAIL.

**[00158]** Na proteína de fusão de acordo com a invenção, a atividade antitumor de TRAIL é potencializada pela formação de poros na membrana celular ou mitocondrial que resulta na perturbação de carga eletrostática da célula, vazamento de íons a partir do citoplasma ou desestabilização de mitocôndria potencial eletrostática e libera para o citoplasma de fatores tal como citocromo C, SMAC/DIABLO ou AIF fator, que por sua vez ativa internamente sinérgica apoptose induzida com o sinal a partir da fixação de TRAIL aos receptores funcionais de série DR.

**[00159]** As novas proteínas de fusão também exibem pelo menos uma característica de atividade hemolítica reduzida ou limitada, ou até mesmo eliminada substancialmente para os peptídeos citolíticos naturais individuais.

**[00160]** Em uma das modalidades da invenção, o domínio (a) e domínio (b) são aglutinados por pelo menos um domínio (c) compreendendo a sequência de um local de clivagem reconhecido por proteases presentes no ambiente celular, especialmente no ambiente celular tumoral, por exemplo, tal como metaloprotease, uroquinase ou furina.

**[00161]** Sequências reconhecidas por protease pode ser selecionada a partir:

**[00162]** - uma sequência reconhecida por Pro Leu Gly Leu Ala Gly Glu Pro/ PLGLAGEP de MMP de



metaloprotease, ou fragmento desse a qual com o último amino ácido da sequência à qual é fixada forma uma sequência reconhecida pela MMP de metaloprotease,

- uma sequência reconhecida por uPA Arg Val Val Arg/RVVR de uroquinase, ou fragmento dessa, a qual com o último amino ácido da sequência à qual é fixada forma uma sequência reconhecida por uroquinase,

e combinações desses, ou

- uma sequência reconhecida por Arg Gln Pro Arg/RQPR, Arg Gln Pro Arg Gly/RQPRG, Arg Lys Lys Arg/RKKR) furina, ou outras sequências atípicas reconhecidas por furina reveladas por M. Gordon et al., in Inf. and Immun, 1995, 63, No. 1, p. 82 a 87, ou sequências nativas reconhecidas por Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu/RHRQPRGWEL furina ou HisArgGlnProArgGlyTrpGluGln / HRQPRGWEL) ou fragmento dessa, a qual com o último amino ácido da sequência à qual está fixada forma uma sequência reconhecida por furina.

**[00163]** Em uma das modalidades da invenção, o local de clivagem de protease é uma combinação da sequência reconhecida pela MMP de metaloprotease e/ou uma sequência reconhecida por uPA de uroquinase e/ou uma sequência reconhecida por furina localizada perto uma da outra em qualquer ordem.

**[00164]** Preferencialmente, em uma das modalidades o domínio (c) é uma sequência reconhecida por furina selecionada a partir de Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly/ RVVRPLGLAG e Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg/PLGLAGRVVR.

**[00165]** As MMP metaloprotease proteases, uPA de uroquinase e furina são superexpressas no ambiente tumoral. A presença da sequência reconhecida pela protease permite a clivagem de domínio (a) a partir do domínio (b), ou seja, a

liberação do domínio funcional (b) e depois a sua ativação acelerada.

**[00166]** A ativação do peptídeo efetor - domínio (b) funcional após a internalização da proteína de fusão na célula pode ocorrer não especificamente por uma clivagem de domínio (a) a partir do domínio (b) da proteína de fusão da invenção por enzimas lisossomais (proteases não específicas).

**[00167]** A presença do local de clivagem de protease, ao permitir a rápida liberação do peptídeo efetor, aumenta as chances de transportar o peptídeo para o local de sua ação como resultado do corte do fragmento de hTRAIL por meio de protease superexpressa no ambiente tumoral antes que ocorra a degradação aleatória da proteína de fusão por protease não específica.

**[00168]** Adicionalmente, um domínio de transporte (d) pode ser anexado ao domínio (b) do peptídeo efetor da proteína de fusão da invenção.

**[00169]** O domínio (d) pode ser selecionado a partir do grupo que consiste de:

(d1) sequência de polihistidina transportando através da membrana celular, que consiste de 6, 7 , 8, 9, 10 ou 11 resíduos de histidina (His/H); e

(d2) sequência de poliarginina transportando através da membrana celular, que consiste de 6, 7 , 8, 9, 10 ou 11 resíduos de arginina (Arg/R),

(d3) sequência de transporte de PD4 (domínio 4 de transdução de proteína) Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala /YARAAARQARA,

(d4) uma sequência de transporte que consiste de sequência de aglutinação de receptor de transferrina Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro /THRPPMWSPVWP,

(d5) sequência de transporte PD5 (domínio 5 de transdução

de proteína, proteína TAT) Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg /YGRKKRRQRRR, ou fragmentos dessa, a qual com o último amino ácido da sequência à qual eles estão fixados formam sequências de domínios de transporte (d1) ou (d2); e - combinações desses.

**[00170]** A combinação de domínios, por exemplo (d1) e (d2), pode compreender em particular a combinação (d1)/(d2) e (d2)/(d1).

**[00171]** Ademais, a combinação de domínios, por exemplo (d1) e (d2), pode incluir domínios localizados próximos entre si e conectados a uma extremidade de domínio (b) e/ou domínios aglutinados a diferentes extremidades de domínio (b).

**[00172]** Deve ser entendido que no caso em que a proteína de fusão possui o domínio de transporte (d) fixado tanto ao domínio (b) quanto ao domínio (c) do local de clivagem entre os domínios (a) e (b), então o domínio (c) é localizado de tal maneira que após a clivagem do domínio de transporte de construção (d) permanece fixado ao domínio (b). Em outras palavras, se a proteína de fusão contiver tanto o domínio de transporte (d) quanto o domínio de local de clivagem (c), então o domínio (d) está localizado entre o domínio (b) e o domínio (c), ou está localizado na extremidade do domínio (b) oposta ao local de fixação do domínio (d).

**[00173]** A invenção compreende também uma variante, em que o domínio (d) está localizado entre dois domínios (c), que é a variante em que após a clivagem do domínio de transporte de construção, preferencialmente o domínio de translocalização, não é fixado nem ao domínio de TRAIL nem ao domínio de peptídeo efetor.

**[00174]** A invenção não compreende uma dita variante em que o domínio (d) está localizado entre o domínio (c) e o

domínio (a), que é a variante em que após a clivagem do domínio de transporte de construção permanece fixada ao domínio de TRAIL.

**[00175]** Em outra modalidade, entre o domínio (a) e o domínio (b), está adicionalmente localizado o domínio (e) compreendendo uma sequência adequada para fixação de uma molécula de PEG à proteína de fusão (ligante de peguilação). Um dito ligante pode ser uma sequência conhecida Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly/ASGCGPEG ou fragmentos dessa, a qual com o último amino ácido da sequência à qual está fixada forma uma sequência adequada para fixação de uma molécula de PEG. O ligante de peguilação pode ser também selecionado a partir do grupo do seguinte: Ala Ala Cys Ala Ala/AACAA, Ser Gly Gly Cys Gly Gly Ser/SGGCGGS e Ser Gly Cys Gly Ser/SGCGS, ou fragmento desses, o qual com o último amino ácido da sequência à qual ela é fixada forma uma sequência adequada para fixar uma molécula de PEG.

**[00176]** Preferencialmente, a sequência de ligante de peguilação é Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly/ASGCGPEG.

**[00177]** Além dos principais elementos funcionais da proteína de fusão e do(s) domínio(s) do local de clivagem, as proteínas de fusão da invenção podem conter uma sequência/sequências neutra(s) de um ligante estérico flexível. Ditos ligantes estéricos são bastante conhecidos da técnica e descritos na literatura. A sua incorporação na sequência da proteína de fusão é pretendida para prover a correta flexão de proteínas produzidas pelo processo de sua superexpressão nas células hospedeiras. Em particular, o ligante estérico pode ser um aglutinados de glicina, de glicina-serina ou de glicina-cisteína-alanina.

**[00178]** Em particular, o ligante estérico pode ser uma combinação de resíduos de glicina e de serina tal como

Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGS ou qualquer fragmento desse que age como ligante estérico, por exemplo um fragmento de Gly Gly Gly Ser/GGGS, Gly Gly Gly/GGG ou Gly Gly Gly Gly/GGGG, Gly Gly Ser Gly Gly, Gly Gly Ser Gly/GGSG, Gly Ser Gly/GSG ou Ser Gly Gly/SGG, ou combinações desses.

**[00179]** Em outra modalidade, o ligante estérico pode ser qualquer combinação de resíduos de glicina, serina e alanina tal como Ala Ser Gly Gly/ASGG, ou qualquer fragmento desse que age como ligante estérico, por exemplo, Ala Ser Gly/ASG. É possível também utilizar a combinação de ligantes estéricos, por exemplo, a sequência Gly Gly Gly Ser Gly / GGGS ou qualquer fragmento desses que age como ligante estérico, por exemplo, o fragmento Gly Gly Gly/GGG, com outro fragmento que age como ligante estérico. Em dito caso, o ligante estérico pode ser uma combinação de resíduos de glicina, serina e alanina, tal como Gly Gly Gly Ser Ala Ser Gly Gly/GGGSASGG, Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly /GGSGGSGGG, Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser/GGSGGGGGS ou Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser / GGGGGGS. Ainda em outra modalidade, o ligante estérico pode ser uma combinação de resíduos de serina e de histidina Ser His His Ser/SHHS ou Ser His His Ala Ser/SHHAS.

**[00180]** Ainda em outra modalidade, o ligante estérico pode ser também selecionado a partir de resíduos únicos de amino ácidos tal como resíduo de glicina ou de cisteína únicos, em particular um ou dois até quatro resíduos de glicina ou de cisteína.

**[00181]** Em outra modalidade, o ligante pode ser formado também por um fragmento de ligantes estéricos descritos acima, o qual com o amino ácido terminal da sequência ao qual ele está fixado forma uma sequência de ligante estérico.

**[00182]** Em outra modalidade, o ligante estérico pode promover a formação e a estabilização da estrutura do trímero da proteína de fusão da invenção, aumentando então a sua meia-vida no sistema de circulação sanguínea e impedindo a desassociação que pode afetar a atividade da proteína após a administração no sistema de circulação sanguínea. Nesse caso, o ligante é uma combinação de cisteína e de alanina, por exemplo, um fragmento de Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys / CAAACAAC ou Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys / CAACAAAC ou fragmento desse, que é a sequência de amino ácido terminal ao qual ele está fixado e forma uma sequência de ligante estérico que estabelece a estrutura do trímero.

**[00183]** Além disso, o ligante estérico pode ser útil também para ativação de domínio funcional (b), que ocorre de uma maneira não específica. A ativação de domínio (b) de uma maneira não específica pode ser desempenhada cortando o domínio (a) a partir do domínio (b) da proteína de fusão de acordo com a invenção devido à hidrólise dependente de pH do ligante estérico.

**[00184]** As modalidades particulares da proteína de fusão da invenção são proteínas de fusão compreendendo um peptídeo de formação de poro selecionado a partir do grupo de peptídeos representado por: SEQ. N° 34, SEQ. N° 35; SEQ. N° 36, SEQ. N° 37, SEQ. N° 38, SEQ. N° 39, SEQ. N° 40, SEQ. N° 41, SEQ. N° 42, SEQ. N° 43, SEQ. N° 44, SEQ. N° 45, SEQ. N° 46, SEQ. N° 47, SEQ. N° 48, SEQ. N° 49, SEQ. N° 50, SEQ. N° 51, SEQ. N° 52, SEQ. N° 53, SEQ. N° 54, SEQ. N° 55m SEQ. N° 56, SEQ. N° 125, SEQ. N° 126, SEQ. N° 127, SEQ. N° 128, SEQ. N° 129, SEQ. N° 130, SEQ. N° 131, and SEQ. N° 132.

**[00185]** Uma descrição detalhada da estrutura de proteínas de fusão representativas mencionadas acima são mostradas nos Exemplos apresentados abaixo.

**[00186]** De acordo com a presente invenção, por proteína de fusão se quer dizer uma única molécula de proteína contendo duas ou mais proteínas ou fragmentos desses, aglutinados de maneira covalente via ligação de peptídeo dentro das suas respectivas cadeias de peptídeos, sem ligantes químicos adicionais.

**[00187]** A proteína de fusão pode ser descrita alternativamente também como uma construção de proteína ou uma proteína quimérica. De acordo com a presente invenção, os termos "construção" ou "proteína quimérica", se utilizado, deve ser entendido como se referindo à proteína de fusão conforme definido acima.

**[00188]** Para uma pessoa com habilidade na técnica ficará aparente que a proteína de fusão definida assim pode ser sintetizada por métodos conhecidos de síntese química de peptídeos e de proteínas.

**[00189]** A proteína de fusão pode ser sintetizada por métodos de síntese de peptídeo química, especialmente utilizando as técnicas de síntese de peptídeo na fase sólida utilizando resinas adequadas como portadoras. As ditas técnicas são convencionais e conhecidas na técnica, e descritas inter alia nas monografias, tal como por exemplo, Bodanszky e Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, 1984, Springer-Verlag, New York, Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª Edição, 1984, Pierce Chemical Company.

**[00190]** A proteína de fusão pode ser sintetizada pelos métodos de síntese química de peptídeos como uma proteína contínua. Alternativamente, os fragmentos individuais (domínios) de proteína podem ser sintetizados separadamente e então combinados juntos em um peptídeo contínuo via uma ligação de peptídeo, por condensação do término de amino de um fragmento de peptídeo a partir do término de carboxila

do segundo peptídeo. As ditas técnicas são convencionais e bastante conhecidas.

**[00191]** Preferencialmente, no entanto, a proteína de fusão da invenção é uma proteína recombinante, gerada pelos métodos de expressão de gene de uma sequência de polinucleotídeo que codifica a proteína de fusão nas células hospedeiras.

**[00192]** Para verificação da estrutura do peptídeo resultante, métodos conhecidos da análise de composição de amino ácidos de peptídeos podem ser utilizados, tal como técnica de espectrometria de massa de alta resolução para determinar o peso molecular do peptídeo. A fim de confirmar a sequência de peptídeo, os sequenciadores de proteína podem ser também utilizados, os quais degradam sequencialmente o peptídeo e identificam a sequência de amino ácidos.

**[00193]** Um aspecto adicional da invenção é uma sequência de polinucleotídeo, particularmente sequência de DNA, que codifica a proteína de fusão conforme definido acima.

**[00194]** Preferencialmente, a sequência de polinucleotídeo, particularmente DNA, de acordo com a invenção, que codifica a proteína de fusão conforme definido acima, é uma sequência otimizada para expressão em *E. coli*.

**[00195]** Outro aspecto da invenção é também um vetor de expressão que contém a sequência de polinucleotídeo, particularmente sequência de DNA da invenção conforme definido acima.

**[00196]** Outro aspecto da invenção é também uma célula hospedeira compreendendo um vetor de expressão conforme definido acima.

**[00197]** Uma célula hospedeira preferida para expressão de proteínas de fusão da invenção é uma célula de *E. coli*.



**[00198]** Métodos para geração de proteínas recombinantes, incluindo proteínas de fusão, são bastante conhecidas. Em resumo, essa técnica consiste na geração de molécula de polinucleotídeo, por exemplo molécula de DNA que codifica a sequência de amino ácido da proteína alvo e direciona a expressão da proteína alvo na hospedeira. Então, a proteína alvo que codifica a molécula de polinucleotídeo é incorporada em um vetor de expressão adequado, que garante uma expressão eficiente do polipeptídeo. O vetor de expressão recombinante é então introduzido nas células hospedeiras para transfecção/transformação, e consequentemente, uma célula hospedeira transformada é produzida. Isso é seguido por uma cultura de células transformadas para superexpressar a proteína alvo, purificação de proteínas obtidas, e opcionalmente cortando por clivagem as sequências de marca utilizadas para expressão ou purificação da proteína.

**[00199]** As técnicas adequadas de expressão e purificação são descritas, por exemplo, na monografia Goeddel, Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), e A. Staron et al., Advances Mikrobiol., 2008, 47, 2, 1983 a 1995.

**[00200]** Cosmídeos, plasmídeos ou vírus modificados podem ser utilizados como vetores de expressão para a introdução e replicação de sequências de DNA nas células hospedeiras. Tipicamente, os plasmídios são utilizados como vetores de expressão. Os plasmídeos adequados são bastante conhecidos e comercialmente disponíveis.

**[00201]** O vetor de expressão da invenção compreende uma molécula de polinucleotídeo que codifica a proteína de fusão da invenção e as sequências regulatórias necessárias para transcrição e translação da sequência de codificação incorporada em uma célula hospedeira adequada. A seleção de

sequências regulatórias depende do tipo de células hospedeiras, e pode ser facilmente executada por uma pessoa com habilidade na técnica. Os exemplos das ditas sequências regulatórias são promotor transcricional e intensificador ou sequência de aglutinação de polimerase de RNA, sequência de aglutinação de ribossoma, contendo o sinal de iniciação de transcrição, inserido antes da sequência de codificação, e a sequência de encerramento de transcrição, inserida após a sequência de codificação. Ademais, dependendo da célula hospedeira e do vetor utilizados, outras sequências podem ser introduzidas no vetor de expressão, tal como a origem de replicação, locais de restrição de DNA adicionais, intensificadores, e sequências que permitem a indução de transcrição.

**[00202]** O vetor de expressão irá compreender também uma sequência de gene de marcação, que confere fenótipos definidos à célula transformada e permite uma seleção específica de células transformadas. Ademais, o vetor pode também conter uma segunda sequência de marcação que permite distinguir as células transformadas com plasmídeo recombinante contendo sequência de codificação inserida da proteína alvo a partir daqueles que retomaram o plasmídeo sem inserção. Muito geralmente, os marcadores de resistência a antibiótico típicos são utilizados, no entanto, quaisquer outros genes de comunicação conhecidos no campo podem ser utilizados, cuja presença em uma célula (in vivo) pode ser facilmente determinado utilizando técnicas de autoradiografia, espectrofotometria ou bio e quimioluminescência. Por exemplo, dependendo da célula hospedeira, os genes de comunicação tal como  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase, luciferase, acetiltransferase de cloranfenicol ou proteína de fluorescência verde podem ser utilizados.

**[00203]** Ademais, o vetor de expressão pode conter sequência de sinal, proteínas de transporte para o compartimento celular adequado, por exemplo, periplasma, em que a flexão é facilitada. Adicionalmente, uma sequência que codifica uma etiqueta/marcação, tal como Etiqueta His fixada ao terminal N ou GST fixado ao terminal C, pode estar presente, que facilita a purificação subsequente da proteína produzida utilizando o princípio de afinidade, via cromatografia de afinidade em uma coluna de níquel. As sequências adicionais que protegem a proteína contra a degradação proteolítica nas células hospedeiras, bem como as sequências que aumentam a sua solubilidade podem estar presentes também.

**[00204]** O elemento auxiliar fixado à sequência da proteína alvo pode bloquear a sua atividade, ou ser prejudicial por outra razão, tal como por exemplo, devido à toxicidade. Dito elemento deve ser removido, o qual pode ser alcançado por clivagem enzimática ou química. Em particular, uma etiqueta de His com seis etiquetas de histidina ou outros marcadores desse tipo fixados para permitir a purificação de proteína por cromatografia de afinidade deve ser removido, devido ao seu efeito descrito em relação à toxicidade do fígado de proteína TRAIL solúvel. Os sistemas de expressão heteróloga baseado nas diversas células hospedeiras bastante conhecidas podem ser utilizadas também, incluindo células procarióticas: bacteriana, tal como *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*, leveduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris*, e linhas de células eucarióticas (inseto, mamíferos, plantas).

**[00205]** Preferencialmente, devido à facilidade de manipulação de cultura e genética, e a uma grande quantidade de produto obtido, o sistema de expressão de *E.*

*coli* é utilizado. Consequentemente, a sequência de polinucleotídeo contendo a sequência alvo que codifica a proteína de fusão da invenção será otimizado para a expressão em *E. coli*, ou seja, conterá na sequência de codificação códons ideais para a expressão em *E. coli*, selecionado a partir de variantes de sequência possíveis conhecidas no estado da técnica. Ademais, o vetor de expressão conterá os elementos acima descritos adequados para *E. coli* fixados à sequência de codificação.

**[00206]** Consequentemente, em uma modalidade preferida da invenção, uma sequência de polinucleotídeo compreendendo uma sequência que codifica uma proteína de fusão da invenção, otimizada para a expressão em *E. coli* é selecionada a partir do grupo de sequências de polinucleotídeo que consistem de:

SEQ. N° 57; SEQ. N° 58; SEQ. N° 59; SEQ. N° 60; SEQ. N° 61; SEQ. N° 62; SEQ. N° 63; SEQ. N° 64; SEQ. N° 65; SEQ. N° 66; SEQ. N° 67; SEQ. N° 68; SEQ. N° 69; SEQ. N° 70; SEQ. N° 71; SEQ. N° 72; SEQ. N° 73; SEQ. N° 74; SEQ. N° 75; SEQ. N° 76; SEQ. N° 77; SEQ. N° 78; SEQ. N° 79; SEQ. N° 80; SEQ. N° 81; SEQ. N° 82, SEQ. N° 83; SEQ. N° 84; SEQ. N° 85; SEQ. N° 86; SEQ. N° 87; SEQ. N° 88; SEQ. N° 89; SEQ. N° 108; SEQ. N° 109; SEQ. N° 110; SEQ. N° 111; SEQ. N° 112; SEQ. N° 113; SEQ. N° 114, SEQ. N° 115; SEQ. N° 116; SEQ. N° 117; SEQ. N° 118; SEQ. N° 119; SEQ. N° 120; SEQ. N° 121; SEQ. N° 122; SEQ. N° 123 e SEQ. N° 124, que codifica as proteínas de fusão que têm sequências de amino ácidos que correspondem às sequências de amino ácidos selecionadas a partir do grupo que consiste de sequências de amino ácidos, respectivamente:

SEQ. N° 1; SEQ. N° 2; SEQ. N° 3; SEQ. N° 4; SEQ. N° 5; SEQ. N° 6; SEQ. N° 7; SEQ. N° 8; SEQ. N° 9; SEQ. N° 10; SEQ. N° 11; SEQ. N° 12; SEQ. N° 13; SEQ. N° 14; SEQ. N° 15; SEQ. N°

16; SEQ. N° 17; SEQ. N° 18; SEQ. N° 19; SEQ. N° 20; SEQ. N° 21; SEQ. N° 22; SEQ. N° 23; SEQ. N° 24; SEQ. N° 25; SEQ. N° 26, SEQ. N° 27; SEQ. N° 28; SEQ. N° 29; SEQ. N° 30; SEQ. N° 31; SEQ. N° 32; SEQ. N° 33; SEQ. N° 91; SEQ. N° 92; SEQ. N° 93; SEQ. N° 94; SEQ. N° 95; SEQ. N° 96; SEQ. N° 97, SEQ. N° 98; SEQ. N° 99; SEQ. N° 100; SEQ. N° 101; SEQ. N° 102; SEQ. N° 103; SEQ. N° 104; SEQ. N° 105; SEQ. N° 106, e SEQ. N° 107.

**[00207]** Em uma modalidade preferida, a invenção também provê um vetor de expressão adequado para transformação de *E. coli*, compreendendo a sequência de polinucleotídeo selecionada a partir do grupo de sequências de polinucleotídeos SEQ. N° 57 a SEQ. N° 87 e SEQ. N° 108 a SEQ. N° 124 indicadas acima, bem como célula de *E. coli* transformada com um dito vetor de expressão.

**[00208]** Transformação, ou seja, introdução de uma sequência de DNA em células hospedeiras bacterianas, particularmente *E. coli*, é geralmente desempenhado nas células competentes, preparadas para ocupar o DNA por exemplo, por tratamento com íons de cálcio em baixa temperatura (4°C), e então submetendo ao choque de calor (a 37 a 42°C) ou por eletroporação. Ditas técnicas são bem conhecidas e geralmente são determinadas pelo fabricante do sistema de expressão ou são descritas na literatura e em manuais para trabalho laboratorial, tal como Maniatis et al., *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, N.Y., 1982).

**[00209]** O procedimento de superexpressão de proteínas de fusão da invenção no sistema de expressão de *E. coli* será ainda descrito abaixo.

**[00210]** A invenção proverá também uma composição farmacêutica contendo a proteína de fusão da invenção conforme definido acima como um ingrediente ativo e uma portadora adequada aceita farmaceuticamente, diluente e

componentes auxiliares convencionais. A composição farmacêutica conterá uma quantidade eficaz da proteína de fusão da invenção e componentes auxiliares aceitos farmaceuticamente dissolvidos ou dispersos em uma portadora ou diluente, e preferencialmente estará na forma de uma composição farmacêutica formulada em uma forma de dosagem de unidade ou formulação contendo uma pluralidade de doses. As formas e métodos farmacêuticos da sua formulação bem como outros componentes, portadoras e diluentes são conhecidos por uma pessoa com habilidade na técnica e descrita na literatura. Por exemplo, eles estão descritos na monografia de Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. 20, 2000, Mack Publishing Company, Easton, USA.

**[00211]** Os termos "portadora aceita farmaceuticamente, diluente e ingrediente" compreende qualquer solvente, meio de dispersão, tensoativos, antioxidantes, estabilizadores, conservantes (por exemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes de isotonicidade, conhecidos na técnica. A composição farmacêutica da invenção pode conter diversos tipos de portadoras, diluentes e excipientes, dependendo da rota de administração escolhida e da forma de dosagem desejada, tal como formas líquida, sólida e aerosol para rota de administração oral, parenteral, inalada, tópica e caso aquela forma selecionada necessite ser estéril para rota de administração, tal como por injeção. A rota preferida de administração do composição farmacêutica de acordo com a invenção é parenteral, incluindo rotas de injeção tal como intravenosa, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intratumoral, ou por infusões intravenosa únicas ou contínuas.

**[00212]** Em uma modalidade, a composição farmacêutica da invenção pode ser administrada por injeção diretamente no tumor. Em outra modalidade, a composição farmacêutica da

invenção pode ser administrada intravenosamente. Ainda em outra modalidade, a composição farmacêutica da invenção pode ser administrada subcutaneamente ou intraperitonealmente. Uma composição farmacêutica para administração parenteral pode ser uma solução ou dispersão em um meio aquoso ou não aquoso aceito farmacêuticamente, tamponado em um pH adequado e isoosmótico com fluidos corporais, se necessário, e pode também conter antioxidantes, tampões, agentes bacteriostáticos e substâncias solúveis, que tornam a composição compatível com os tecidos ou com o sangue de recipiente. Outros componentes, que podem ser incluídos na composição, são por exemplo, água, alcóois tal como etanol, polióis tal como glicerol, glicol de propileno, glicol de polietileno líquido, lipídios tal como triglicerídeos, óleos vegetais, lipossomas. A fluidez adequada e o tamanho de partículas da substância podem ser providos pelas substâncias de revestimento, tal como lecitina, e tensoativos, tal como hidroxipropil-celulose, polisorbatos e similares.

**[00213]** Os agentes isotonizantes adequados para as composições parenterais líquidas são, por exemplo, açúcares tal como glicose, e cloreto de sódio, e combinações desses.

**[00214]** Alternativamente, a composição farmacêutica para administração por injeção ou infusão pode estar em uma forma de pó, tal como um pó liofilizado para reconstituição imediatamente antes de uso em uma portadora adequada tal como, por exemplo, água sem pirogênio estéril.

**[00215]** A composição farmacêutica da invenção para a administração parenteral pode ter também a forma de administração nasal, incluindo soluções, sprays ou aerosóis. Preferencialmente, a forma para administração intranasal será uma solução aquosa e será isotônica ou tamponado para manter o pH a partir de cerca de 5,5 até

cerca de 6,5, a fim de manter um caráter similar às secreções nasais. Ademais, ela conterá conservantes ou estabilizadores, tal como preparações intranasais bastante conhecidas.

**[00216]** A composição pode conter diversos antioxidantes os quais retardam a oxidação de um ou mais componentes. Ademais, a fim de impedir a ação de microorganismos, a composição pode conter diversos agentes antibacterianos e antifúngicos, incluindo por exemplo, e não limitado a, parabenos, clorobutanol, timerosal, ácido sórbico e substâncias similares conhecidas desse tipo. Em geral, a composição farmacêutica da invenção pode incluir, por exemplo, pelo menos cerca de 0,01% em peso de ingrediente ativo. Mais particularmente, a composição pode conter o ingrediente ativo na quantidade a partir de 1% a 75% por peso da unidade da composição, ou por exemplo, a partir de 25% a 60% por peso, porém não limitado a valores indicados. A quantidade real da dose da composição de acordo com a presente invenção administrada aos pacientes, incluindo homem, será determinada por fatores físicos e fisiológicos, tal como peso corporal, severidade da condição, tipo de doença sendo tratada, intervenções terapêuticas anteriores ou concomitantes, o paciente e a rota de administração. Uma dose de unidade adequada, a dose total e a concentração de ingrediente ativo na composição deve ser determinado pelo médico responsável.

**[00217]** A composição pode ser administrada, por exemplo, em uma dose de cerca de 1 micrograma/kg de peso corporal até cerca de 1000 mg/kg de peso corporal do paciente, por exemplo, na faixa de 5 mg/kg de peso corporal até 100 mg/kg de peso corporal ou na faixa de 5 mg/kg de peso corporal até 500 mg/kg de peso corporal. A proteína de fusão e as composições que a contém exibem características anticâncer



ou antitumorais e podem ser utilizados para o tratamento de doenças de câncer. A invenção também provê o uso da proteína de fusão da invenção conforme definido acima para tratar doenças de câncer em mamíferos, incluindo humanos. A invenção também provê um método de tratamento de doenças neoplásicas/câncer em mamíferos, incluindo humanos, compreendendo administrar em um sujeito que precisa de tal tratamento uma quantidade eficaz anti-neoplástico/anticâncer da proteína de fusão da invenção conforme definido acima, opcionalmente na forma de composição farmacêutica adequada.

**[00218]** A proteína de fusão da invenção pode ser utilizada para o tratamento de malignidades hematológicas tal como leucemia, granulomatoses, mieloma e outras malignidades hematológicas. A proteína de fusão pode ser também utilizado para o tratamento de tumores sólidos tal como câncer de mama, câncer de pulmão, incluindo câncer de pulmão de célula não pequena, câncer de cólon, câncer pancreático, câncer ovariano, câncer de bexiga, câncer de próstata, câncer de rins, câncer cerebral, e similares. A rota de administração adequada da proteína de fusão no tratamento de câncer será em particular rota parenteral, que consiste em administrar a proteína de fusão da invenção na forma de injeções ou infusões, na composição e forma adequadas para essa rota de administração. A invenção será descrita em mais detalhes nos seguintes procedimentos e exemplos gerais de proteínas de fusão específicas.

#### **Procedimento geral para superexpressão da proteína de fusão**

##### **Preparação de um plasmídio**

**[00219]** A sequência de amino ácido de uma proteína de fusão alvo foi utilizada como um modelo para gerar uma sequência de DNA que a codifica, compreendendo códons otimizados para expressão em *Escherichia coli*. Dito

procedimento permite aumentar a eficiência de etapa adicional de síntese de proteína alvo em *Escherichia coli*. A sequência de nucleotídeo resultante foi então automaticamente sintetizada. Adicionalmente, os locais de clivagem de enzimas de restrição NdeI (na extremidade de 5' de filamento principal) e XhoI (na extremidade de 3' de filamento principal) foram adicionados ao gene resultante que codifica a proteína alvo. Esses foram utilizados para clonar o gene no vetor pET28a (Novagen). Eles podem ser utilizados também para clonar o gene que codifica a proteína em outros vetores. A proteína alvo expressa a partir dessa construção pode ser opcionalmente equipada no terminal N com uma etiqueta de polihistidina (seis histidinas), precedida por um local reconhecido por trombina, que serve subsequentemente para a sua purificação via cromatografia de afinidade. Alguns alvos foram expressos sem qualquer etiqueta, em particular sem etiqueta de histidina, e aqueles foram purificados subsequentemente em SP Sepharose. A exatidão da construção resultante foi confirmada primeiramente por análise de restrição de plasmídios isolados utilizando as enzimas NdeI e XhoI, seguido por sequenciamento automático do quadro de leitura inteiro da proteína alvo. Os primers utilizados para sequenciar foram complementares às sequências de promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3') e terminação T7 (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') presente no vetor. O plasmídio resultante foi utilizado para superexpressão da proteína de fusão alvo em uma estirpe comercial de *E. coli*, que foi transformada de acordo com as recomendações do fabricante. As colônias obtidas no meio de seleção (ágar LB, canamicina 50 µg/ml, 1% de glicose) foram utilizados para preparar uma cultura durante a noite em meio líquido de LB suplementado com canamicina (50 µg/ml) e 1% de glicose. Após cerca de 15

horas de crescimento no incubador de agitação, as culturas foram utilizadas para inocular a cultura adequada.

### **Superexpressão e purificação de proteínas de fusão - procedimento geral A**

**[00220]** O meio de LB com canamicina (30 µg/ml) e 100 µM de sulfato de zinco foi inoculado com cultura durante a noite. A cultura foi incubada a 37°C até que a densidade ideal (OD) a 600 nm atingiu 0,60 a 0,80. Então, o IPTG foi adicionado até a concentração final na faixa de 0,25 a 1 mM. Após incubação (3,5 a 20 h) com agitação a 25°C a cultura foi centrifugada por 25 min a 6,000 g. As pelotas bacterianas foram resuspensas em um tampão contendo 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de NaCl, 10 mM de imidazol, pH de 7,4. A suspensão foi sonicada em gelo por 8 minutos (40% de amplitude, pulso de 15 segundos, 10 s de intervalo). O extrato resultante foi clareado por centrifugação por 40 minutos a 20000 g, 4°C. A resina de Ni-Sepharose (GE Healthcare) foi pré-tratada por equilíbrio com tampão, que foi utilizado para preparação do extrato de células bacterianas. A resina foi então incubada durante a noite a 4°C com o sobrenadante obtido após centrifugação do extrato. Então, ele foi carregado na coluna de cromatografia e lavado com 15 a 50 volumes de tampão de 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de NaCl, 20 mM de imidazole, pH de 7,4. A proteína obtida foi eluída a partir da coluna utilizando gradiente de imidazol em 50 mM de tampão de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  com 0,5 M de NaCl, pH de 7,4. As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE. As frações adequadas foram combinadas e dializadas durante a noite a 4°C contra 50 mM de tampão Tris, pH de 7,2, 150 mM de NaCl, 500 mM de L-arginina, 0,1 mM de  $\text{ZnSO}_4$ , 0,01% de Tween 20, e ao mesmo tempo Histag, se presente, foi clivado com trombina (1:50). Após a clivagem, a trombina foi separada a partir da proteína de fusão alvo

expressa com a etiqueta His por purificação utilizando resina Benzamidine Sepharose™. A purificação de proteínas de fusão alvo expressas sem Histag foi realizada em SP Sepharose. A pureza do produto foi analisada por eletroforese de SDS-PAGE (Maniatis et al, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, NY, 1982).

### **Superexpressão e purificação de proteínas de fusão - procedimento geral B**

**[00221]** O meio de LB com canamicina (30 µg/ml) e 100 µM de sulfato de zinco foi inoculado com cultura durante a noite. As culturas foram incubadas a 37°C até que a densidade ideal (OD) em 600 nm atingisse 0,60 a 0,80. Então, o IPTG foi adicionado à concentração final na faixa de 0,5 a 1mM. Após 20 horas de incubação com agitação a 25°C a cultura foi centrifugada por 25 minutos a 6000 g. As células bacterianas após superexpressão foram interrompidas em uma Prensa Francesa em um tampão contendo 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de NaCl, 10 mM de imidazol, 5mM de beta-mercaptoetanol, 0,5mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), pH de 7,8. O extrato resultante foi clareado por centrifugação por 50 minutos a 8000 g. A resina Ni-Sepharose foi incubada durante a noite com o sobrenadante obtido. Então, a resina com proteína vinculada foi empacotada na coluna de cromatografia. A fim de lavar as frações contendo proteínas não ligantes, a coluna foi lavada com 15 a 50 volumes de tampão de 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de NaCl, 10 mM de imidazol, 5mM de beta-mercaptoetanol, 0,5mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), pH de 7,8. Depois, a fim de lavar a maioria das proteínas que aglutinam especificamente com a cama, a coluna foi lavada com um tampão contendo 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de NaCl, 500 mM de imidazol, 10% de glicerol, 0,5 mM de PMSF, pH de 7,5. As frações obtidas foram

analisadas por SDS-PAGE (Maniatis et al, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, NY, 1982). As frações contendo a proteína alvo foram combinadas e, se a proteína foi expressa com etiqueta de histidina, clivada com trombina (1U per 4 mg de proteína, 8 horas a 16°C) a fim de remover a etiqueta de polihistidina. Depois as frações foram dialisadas com formulação de tampão (500 mM de L-arginina, 50 mM de Tris, 2,5 mM de ZnSO<sub>4</sub>, pH de 7,4).

**[00222]** Nessa descrição, os exemplos de proteínas expressos originalmente com etiqueta de histidina que foi subsequentemente removida são designados com índice a) próximo ao número de Exemplo. As proteínas que foram originalmente expressas sem etiqueta de histidina são designadas com índice b) próximo ao número de Exemplo.

#### **Caracterização de proteínas de fusão por eletroforese 2-D**

**[00223]** A fim de ainda caracterizar as proteínas obtidas e selecionar precisamente as condições cromatográficas, os pontos isoelétricos das proteínas foram determinadas. Para esse propósito, dois métodos de eletroforese bi-dimensional (2-D) foi utilizado, em dois estágios de acordo com o seguinte cronograma.

**[00224]** Etapla 1 - Isoeletrofoco de proteínas em um gradiente de pH e condições de desnaturação.

**[00225]** Em preparações de proteína em concentrações de 1 a 2 mg/ml foram precipitadas misturando em uma razão de 1:1 com uma solução de precipitação contendo 10% de ácido tricloroacético e 0,07% de beta-mercaptoetanol em acetona. A mistura foi incubada por 30 min em -20°C e depois centrifugada por 25 minutos em 15.000 g e 4°C. O sobrenadante foi removido e a pelota foi lavada duas vezes com acetona fria com 0,07% de beta-mercaptoetanol. Depois, os resíduos de acetona foram evaporados até que nenhum odor

seja detectável. A pelota de proteína foi suspensa em 250 ml de 8M de uréia de tampão de rehidração, 1% de CHAPS, 15 mM de DTT, 0,5% de anfólitos (GE Healthcare) com um perfil de pH de 3 a 11 ou 6 a 11, dependendo da lâmina usada subsequentemente. A solução de proteína foi posicionada em uma câmara de cerâmica para isoeletrofóco, seguido por 13 cm de DryStrip [lâmina seca] (GE Healthcare) com perfil de pH adequado (3 a 11 ou 6 a 11). O todo foi coberto com uma camada de óleo mineral. As câmaras foram posicionadas no aparelho Ettan IPGphor III, em que o isoeletrofoco foi realizado de acordo com o seguinte programa atribuído às dimensões da lâmina e do perfil do pH: 16 horas de desidração em 20° C.

**[00226]** Focando no campo elétrico em um gradiente de pH fixo

Tempo	Voltagem
1 hora	500 V
1 hora	gradiente 500 a 1000 V
2 horas 30 min	gradiente 1000 a 8000 V
30 min	8000 V

**[00227]** Depois, a lâmina contendo proteínas foi lavada por 1 min em água desionizada, manchada com Brilhante Coomassie e depois descolorizada e arquivada como uma imagem para marcar a localização de proteínas. A lâmina descolorida foi equilibrada 2 x 15 min com um tampão da composição seguinte: 50 mM de Tris-HCl de pH de 8,8, 6M de uréia, 1% de DTT, 2% de SDS, 30% de glicerol.

Etapa 2. Separação em uma segunda direção por SDS-PAGE.

**[00228]** A lâmina foi colocada sobre 12,5% de gel de poliacrilamida contendo um único poço por tamanho padrão e

depois a separação foi realizada em um aparelho para SDS-PAGE, em uma voltagem de 200V por 3 horas. O gel foi manchado com Brilhante Coomassie depois arquivado com a escala aplicada. As proteínas foram identificadas determinando seu peso com base no padrão de tamanho, e seu IPI foi lido para a escala de 6 a 11 com base nas curvas providas pelo fabricante (GE Healthcare) (razão de pH de % de extensão da lâmina a partir da extremidade marcada como anodo) ou uma escala de 3 a 11 com base na curva determinada experimentalmente por meio de kit de calibragem de isoeletrofoco (GE Healthcare).

### **Exemplos**

**[00229]** Os exemplos representativos das proteínas de fusão da invenção estão mostradas nos seguintes Exemplos.

**[00230]** Nos exemplos, as sequências de amino ácidos de proteínas de fusão estão escritas a partir do terminal N até o terminal C da proteína. Nos exemplos, por TRAIL quer-se sempre dizer hTRAIL.

**[00231]** As seguintes designações de componentes de sequências de amino ácidos são utilizadas, em que próximo à designação de três letras, é fornecida a designação equivalente de uma única letra.

LIGANTE 1: ligante estérico Gly Gly/GG

LIGANTE 2: ligante estérico Gly Gly Gly / GGG

LIGANTE 3: ligante estérico Gly Ser Gly / GSG

LIGANTE 4: ligante estérico Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGS

LIGANTE 5: ligante estérico Gly Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGGS

LIGANTE 6: ligante estérico Gly Gly Ser Gly Gly/GGSGG

LIGANTE 7: ligante estérico Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly/GGGSGGG

LIGANTE 8: ligante estérico Gly Gly Gly Gly Ser Gly /GGGGSG

LIGANTE 9: ligante estérico Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser/ GGGSGGGGS

LIGANTE10: ligante estérico Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
Gly Gly / GGGGSGGGG

LIGANTE11: ligante estérico  
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly/ GSGGGSGGG

LIGANTE12: ligante estérico  
Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys/ CAACAAAC

LIGANTE13: ligante estérico  
Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys/ CAAACAAC

LIGANTE 14: ligante estérico Cys/C

LIGANTE 15: ligante estérico Gly/G

LIGANTE16: ligante estérico Ser Gly Gly/SGG

FURINA: sequência clivada por furina Arg Lys Lys Arg / RKKR

FURINA.NAT: sequência nativa clivada por furina His Arg Gln  
Pro Arg Gly Trp Glu Gln / HRQPRGWEQ

UROQUINA: sequência clivada por uroquinase Arg Val Val Arg  
/ RVVR

MMP: sequência clivada por metaloprotease  
Pro Leu Gly Leu Ala Gly/ PLGLAG

PEG1: ligante de peguilação  
Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu/ASGCGPE

PEG2: ligante de peguilação  
Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly/ ASGCGPEG

TRANS1: sequência de transporte His His His His His His  
/HHHHHH

TRANS2: sequência de transporte  
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg/RRRRRRR

TRANS3: sequência de transporte  
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg/RRRRRRRR

TRANS4: sequência de transporte Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg  
Gln Ala Arg Ala /YARAAARQARA

TRANS5: sequência de transporte Thr His Arg Pro Pro Met Trp  
Ser Pro Val Trp Pro /THRPPMWSPVWP

TRANS6: sequência de transporte Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg



Gln Arg Arg Arg /YGRKKRRQRRR

### **Exemplo 1. Proteína de Fusão de SEQ. N° 1**

**[00232]** A proteína de SEQ. N° 1 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 258 amino ácidos e a massa de 29,5 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL 121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a forma ativa com 83 amino ácidos de granulicina humana (SEQ. N° 34) fixada no terminal C de domínio (a).

**[00233]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe o ligante estérico G incorporado sequencialmente, ligante estético (GSG), local de clivagem MMP de metaloprotease (PLGLAG) e local de clivagem de uroquinase (RVVR). Depois, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121-281)-LIGANTE15-LIGANTE3-MMP-UROQUINA-(SEQ. N° 34).

**[00234]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 1 e SEQ. N° 57, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00235]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 1 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 57. Um plasmídio contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi desempenhada de acordo com o procedimento geral A, utilizando a estirpe de *E. coli* Tuner (DE3) por Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

### **Exemplo 2. Proteína de Fusão de SEQ. N° 2**

**[00236]** A proteína de SEQ. N° 2 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 261 amino ácidos e a massa de 30,09

kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL119 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a forma ativa com 83 amino ácidos de granulicina humana (SEQ. N° 34) fixada ao terminal N do domínio (a).

**[00237]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o local de clivagem de uroquinase incorporado sequencialmente (RVVR), local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e ligante estérico (GGGS). Assim, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 34)-UROQUINA-MMP-LIGANTE4-(TRAIL119 a 281).

**[00238]** A sequência de amino e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em E. coli são, respectivamente, SEQ. N° 2 e SEQ. N° 58, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00239]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 2 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 58. Um plasmídio contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de E. coli Tuner (DE3) por Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa tanto com a etiqueta de histidina (Ex. 2<sup>a</sup>) quanto sem a etiqueta de histidina (Ex. 2<sup>b</sup>).

### **Exemplo 3. Proteína de Fusão de SEQ. N° 3**

**[00240]** A proteína de SEQ. N° 3 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 186 amino ácidos e a massa de 21,5 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL 121 a 281, e domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico com 15 amino ácidos sintéticos (SEQ. N° 35) fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00241]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) incorporada sequencialmente e local de clivagem de uroquinase (RVVR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121-281)-MMP-UROQUINA-(SEQ. N° 35)

**[00242]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 3 e SEQ. N° 59, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00243]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 3 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 59. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 4. Proteína de Fusão de SEQ. N° 4**

**[00244]** A proteína de SEQ. N° 4 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 227 amino ácidos e a massa de 25,7 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL 121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a pilosulina-1 com 56 amino ácidos (SEQ. N° 36) fixada ao terminal N do domínio (a).

**[00245]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe local de clivagem de uroquinase (RVVR) incorporada sequencialmente e local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 36)-UROKIN-

MMP-(TRAIL 121-281)

**[00246]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 4 e SEQ. N° 60, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00247]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 4 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 60. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner (DE3)* da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 5. Proteína de fusão de SEQ. N° 5**

**[00248]** A proteína de SEQ. N° 5 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 264 amino ácidos e a massa de 29,5 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL95 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a pilosulina-1 com 56 amino ácidos (SEQ. N° 36) e fixada ao terminal C do domínio (a).

**[00249]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe ligante estérico (CAACAAC) incorporado sequencialmente, ligante estérico (GGG), local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e local de clivagem de uroquinase (RVVR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL95 a 281)-LIGANTE12-LIGANTE2-MMP-UROQUINA(SEQ. N° 36)

**[00250]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 5 e SEQ.

Nº 61, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00251]** A sequência de amino ácido SEQ. Nº 5 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. Nº 61. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 6. Proteína de Fusão de SEQ. Nº 6**

**[00252]** A proteína de SEQ. Nº 6 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 299 amino ácidos e a massa de 33,2 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL95 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a pilosulina 5 de peptídeo com 90 amino ácidos (SEQ. Nº 37) fixada ao terminal C do domínio (a).

**[00253]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe ligante estérico (GSG) incorporado sequencialmente, ligante estérico (CAACAAAC), ligante estérico (GGG), local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR) e ligante estérico (G). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL95 a 281)-LIGANTE3-LIGANTE12-MMP-UROQUINA-LIGANTE15(SEQ. Nº 37)

**[00254]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. Nº 6 e SEQ. Nº 62, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00255]** A sequência de amino ácido SEQ. Nº 6 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para

gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 62. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa tanto com etiqueta de histidina (Ex. 6<sup>a</sup>) quanto sem a etiqueta de histidina (Ex. 6<sup>b</sup>).

**Exemplo 7. Proteína de Fusão de SEQ. N° 7**

**[00256]** A proteína de SEQ. N° 7 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 224 amino ácidos e a massa de 25,6 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL95 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo ativo com 17 amino ácidos a partir de taquiplesina (SEQ. N° 38) fixada ao terminal C do domínio (a).

**[00257]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe ligante estérico (CAACAAAC) incorporado sequencialmente, ligante estérico (GG), local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e local de clivagem de uroquinase (RVVR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL95 a 281)-LIGANTE12-LIGANTE1-MMP-UROQUINA-(SEQ. N° 38)

**[00258]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 7 e SEQ. N° 63, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00259]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 7 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 63. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi

executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa tanto com etiqueta de histidina (Ex. 7<sup>a</sup>) quanto sem a etiqueta de histidina (Ex. 7<sup>b</sup>).

**Exemplo 8. Proteína de Fusão de SEQ. N° 8**

**[00260]** A proteína de SEQ. N° 8 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 202 amino ácidos e a massa de 23,8 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL114 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo ativo com 17 amino ácidos a partir de taquiplesina (SEQ. N° 38) fixada ao terminal C do domínio (a).

**[00261]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) incorporado sequencialmente, local de clivagem de uroquinase (RVVR) e sequência de transporte de 7-arginina (RRRRRRR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL114 a 281)-MMP-UROQUINA-TRANS2-(SEQ. N° 38)

**[00262]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 8 e SEQ. N° 64, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00263]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 8 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 64. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner*

(DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa tanto com etiqueta de histidina (Ex. 8<sup>a</sup>) quanto sem a etiqueta de histidina (Ex. 8<sup>b</sup>).

**Exemplo 9. Proteína de Fusão de SEQ. N° 9**

**[00264]** A proteína de SEQ. N° 9 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 243 amino ácidos e a massa de 27,6 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL95 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é uma bombesina-magainina de peptídeo de fusão com 38 amino ácidos (SEQ. N° 39) fixada ao terminal N do domínio (a).

**[00265]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o local de clivagem de uroquinase (RVVR) incorporado sequencialmente, local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e ligante estérico (CAAACAAC). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 39)-UROQUINA-MMP-LIGANTE13-(TRAIL95 a 281)

**[00266]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 9 e SEQ. N° 65, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00267]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 9 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 65. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.



**Exemplo 10. Proteína de Fusão de SEQ. N° 10**

**[00268]** A proteína de SEQ. N° 10 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 196 amino ácidos e a massa de 22,4 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL119 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a magainina-2 com 23 amino ácidos (SEQ. N° 40) fixada ao terminal N do domínio (a).

**[00269]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o local de clivagem de uroquinase (RVVR) incorporado sequencialmente e o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 40)-UROQUINA-MMP-(TRAIL119 a 281)

**[00270]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 10 e SEQ. N° 66, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00271]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 10 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 66. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner (DE3)* da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

**Exemplo 11. Proteína de Fusão de SEQ. N° 11**

**[00272]** A proteína de SEQ. N° 11 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 202 amino ácidos e a massa de 23 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o

domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico com 14 amino ácidos (SEQ. N° 41) fixada ao terminal C do domínio (a).

**[00273]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe o ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, local de clivagem de uroquinase (RVVR), local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e sequência de transporte de arginina de 8 (RRRRRRRR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121-281)-LIGANTE10-UROQUINA-MMP-TRANS3-(SEQ. N° 41)

**[00274]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 11 e SEQ. N° 67, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00275]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 11 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 67. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa tanto com etiqueta de histidina (Ex. 11<sup>a</sup>) quanto sem etiqueta de histidina (Ex. 11<sup>b</sup>).

#### **Exemplo 12. Proteína de Fusão de SEQ. N° 12**

**[00276]** A proteína de SEQ. N° 12 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 205 amino ácidos e a massa de 23,2 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico sintético com 14 amino ácidos (SEQ. N° 41) fixada ao

terminal C do domínio (a).

**[00277]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe o ligante estérico (GG) incorporado sequencialmente, sequência de ligante de peguilação (ASGCGPEG), a sequência de ligante estérico (GGG), o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR) e sequência de transporte de poliarginina (RRRRRRR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL 121 a 281)-LIGANTE1-PEG2-LIGANTE2-MMP-UROQUINA-TRANS2-(SEQ. N° 41)

**[00278]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 12 e SEQ. N° 68, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00279]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 12 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 68. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

### **Exemplo 13. Proteína de Fusão de SEQ. N° 13**

**[00280]** A proteína de SEQ. N° 13 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 228 amino ácidos e a massa de 25,9 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL95 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico com 14 amino ácidos (SEQ. N° 41) fixada ao terminal C do domínio (a).

**[00281]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe o ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, local de clivagem de uroquinase (RVVR), o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e a sequência de transporte de arginina de 8 (RRRRRRRR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL 95 A 281)-LIGANTE10-UROQUINA-MMP-TRANS3-(SEQ. N° 41)

**[00282]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 13 e SEQ. N° 69, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00283]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 13 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 69. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa tanto com etiqueta de histidina (Ex. 13<sup>a</sup>) quanto sem etiqueta de histidina (Ex. 13<sup>b</sup>).

#### **Exemplo 14. Proteína de Fusão de SEQ. N° 14**

**[00284]** A proteína de SEQ. N° 14 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 192 amino ácidos e a massa de 22,1 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico com 14 amino ácidos sintéticos (SEQ. N° 41) fixada ao terminal N do domínio (a).

**[00285]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio

(a), existe o ligante estérico (C) incorporado sequencialmente, local de clivagem de uroquinase (RVVR) e o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG). Adicionalmente no terminal N do peptídeo efetor está fixado o domínio de transporte de polihistidina (HHHHHH). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: TRANS1-(SEQ. N° 41)-LIGANTE14-UROQUINA-MMP-(TRAIL 121 a 281)

**[00286]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 14 e SEQ. N° 70, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00287]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 14 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 70. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa tanto com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 15. Proteína de Fusão de SEQ. N° 15**

**[00288]** A proteína de SEQ. N° 15 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 200 amino ácidos e a massa de 23,3 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico com 14 amino ácidos (SEQ. N° 41) é fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00289]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o ligante estérico (C) incorporado

sequencialmente, sequência de transporte de 8-arginina (RRRRRRRR), local de clivagem de uroquinase (RVVR) e o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG). Adicionalmente a sequência de transporte de histidina (HHHHHH) é fixada ao terminal N do peptídeo efetor. Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: TRANS1-(SEQ. N° 41)-LIGANTE14-TRANS3-UROQUINA-MMP-(TRAIL 121-281)

**[00290]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 15 e SEQ. N° 71, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00291]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 15 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 71. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 16. Proteína de Fusão de SEQ. N° 16**

**[00292]** A proteína de SEQ. N° 16 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 202 amino ácidos e a massa de 23,1 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico com 14 amino ácidos (SEQ. N° 41) é fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00293]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe o ligante estérico (GGGGSGGGG) incorporado

sequencialmente, local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR) e sequência de transporte de 8-arginina (RRRRRRRR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL 121-281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-TRANS3- (SEQ. N° 41)

**[00294]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 16 e SEQ. N° 72, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00295]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 16 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 72. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli* Tuner (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa tanto com etiqueta de histidina (Ex. 16<sup>a</sup>) quanto sem a etiqueta de histidina (Ex. 16<sup>b</sup>).

#### **Exemplo 17. Proteína de Fusão de SEQ. N° 17**

**[00296]** A proteína de SEQ. N° 17 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 208 amino ácidos e a massa de 23,5 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL116 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a A-melitina cecropina de peptídeo híbrido com 26 amino ácidos (SEQ. N° 42) é fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00297]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o local de clivagem de uroquinase (RVVR) incorporado sequencialmente e o local de clivagem de

metaloprotease (PLGLAG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 42)-UROQUINA-MMP-(TRAIL 116-281)

**[00298]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 17 e SEQ. N° 73, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00299]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 17 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 73. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner (DE3)* da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 18. Proteína de Fusão de SEQ. N° 18**

**[00300]** A proteína de SEQ. N° 18 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 203 amino ácidos e a massa de 23,6 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL116 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo com 27 amino ácidos hCAP-18/LL-37(SEQ. N° 43) fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00301]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o local de clivagem de uroquinase (RVVR) incorporado sequencialmente e o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 43)-UROQUINA-MMP-(TRAIL 116-281)

**[00302]** A sequência de amino ácido e a sequência de



codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 18 e SEQ. N° 74, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00303]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 18 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 74. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 19. Proteína de Fusão de SEQ. N° 19**

**[00304]** A proteína de SEQ. N° 19 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 203 amino ácidos e a massa de 23,3 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL116 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo com 27 amino ácidos BAMP-28 (SEQ. N° 44) fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00305]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o local de clivagem de uroquinase (RVVR) incorporado sequencialmente e o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 44)-UROQUINA-MMP-(TRAIL 116-281)

**[00306]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 19 e SEQ. N° 75, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00307]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 19 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 75. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

**Exemplo 20. Proteína de Fusão de SEQ. N° 20**

**[00308]** A proteína de SEQ. N° 20 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 200 amino ácidos e a massa de 22,8 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o análogo com 24 amino ácidos de isoforma C do peptídeo lítico a partir da *Entamoeba histolytica* (SEQ. N° 45) fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00309]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe o ligante estérico (GGSGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e local de clivagem de uroquinase (RVVR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121-281)-LIGANTE6-MMP-UROQUINA-(SEQ. N° 45)

**[00310]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 20 e SEQ. N° 76, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00311]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 20 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 76. Um

plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

**Exemplo 21. Proteína de Fusão de SEQ. N° 20**

**[00312]** A proteína de SEQ. N° 20 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 200 amino ácidos e a massa de 22,8 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o análogo com 24 amino ácidos de isoforma A do peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica* (SEQ. N° 46) fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00313]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe o ligante estérico (GGSGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e local de clivagem de uroquinase (RVVR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121-281)-LIGANTE6-MMP-UROQUINA-(SEQ. N° 46)

**[00314]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 21 e SEQ. N° 77, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00315]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 21 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 77. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos

acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 22. Proteína de Fusão de SEQ. N° 22**

**[00316]** A proteína de SEQ. N° 22 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 200 amino ácidos e a massa de 22,8 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o análogo com 24 amino ácidos de isoforma B de um peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica* (SEQ. N° 47) fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00317]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe o ligante estérico (GGSGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e local de clivagem de uroquinase (RVVR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121-281)-LIGANTE6-MMP-UROQUINA-(SEQ. N° 47)

**[00318]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 22 e SEQ. N° 78, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00319]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 22 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 78. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese

de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

**Exemplo 23. Proteína de Fusão de SEQ. N° 23**

**[00320]** A proteína de SEQ. N° 23 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 190 amino ácidos e a massa de 22,1 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o fragmento de 12 amino ácidos de domínio HA2 de hemaglutinina de vírus da influenza (SEQ. N° 48) fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00321]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe a sequência de transporte de 7 argininas (RRRRRRR), o local de clivagem de uroquinase (RVVR) e local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 48)-TRANS2-UROQUINA-MMP-(TRAIL 121-281)

**[00322]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 23 e SEQ. N° 79, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00323]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 23 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 79. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral B, utilizando estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) ou Tuner (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa tanto com etiqueta de histidina (Ex. 23<sup>a</sup>) quanto sem etiqueta de histidina (Ex. 23<sup>b</sup>).

**Exemplo 24. Proteína de Fusão de SEQ. N° 24**

**[00324]** A proteína de SEQ. N° 24 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 429 amino ácidos e a massa de 48,6 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o fragmento de 247 amino ácidos de domínio de terminal N de alfa-toxina a partir de *Clostridium perfringens* com atividade de C fosfolipase (SEQ. N° 49) fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00325]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o ligante estérico (G) incorporado sequencialmente, o ligante estérico (GGGGGS), ligante de peguilação (ASGCGPE) e o ligante estérico (GGGGGS). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 49)-LIGANTE15-LIGANTE5-PEG2-LIGANTE5-(TRAIL121 A 281)

**[00326]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 24 e SEQ. N° 80, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00327]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 24 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 80. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli* Tuner (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

**Exemplo 25. Proteína de Fusão de SEQ. N° 25**

**[00328]** A proteína de SEQ. N° 25 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 658 amino ácidos e a massa de 73 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a listeriolisina O de peptídeo com 468 amino ácidos (SEQ. N° 50) fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00329]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o ligante estérico (G) incorporado sequencialmente, o ligante estérico (GGGSGGGGGS), local de clivagem de furina (RKKR), ligante de peguilação (ASGCGPEG) e sequência de ligante estérico (GGGGGS). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 50)-LIGANTE15-LIGANTE9-FURINA-PEG2-LIGANTE5-(TRAIL 121 A 281)

**[00330]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 25 e SEQ. N° 81, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00331]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 25 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 81. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 26. Proteína de Fusão de SEQ. N° 26**

**[00332]** A proteína de SEQ. N° 26 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 478 amino ácidos e a massa de 54 kDa,

em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a fosfolipase PC-PLC de 289 amino ácidos (SEQ. N° 51) fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00333]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o ligante estérico (GGGSGGGGS) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de furina (RKKR), ligante de peguilação (ASGCGPEG) e ligante estérico (GGGGGS). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 51)-LIGANTE9-FURINA-PEG2-LIGANTE5-(TRAIL 121 A 281)

**[00334]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 26 e SEQ. N° 82, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00335]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 26 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 82. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 27. Proteína de Fusão de SEQ. N° 27**

**[00336]** A proteína de SEQ. N° 27 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 361 amino ácidos e a massa de 40,2 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a equinatoxina EqTx-II de 179 amino ácidos (SEQ. N° 52) fixado ao terminal N do



domínio (a).

**[00337]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe o ligante estérico (GGGS) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de furina (RKKR), ligante de peguilação (ASGCGPEG) e ligante estérico (GGGS). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 52)-LIGANTE4-FURINA-PEG1-LIGANTE4-(TRAIL 121 A 281)

**[00338]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 27 e SEQ. N° 83, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00339]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 27 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 83. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) ou Tuner (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 28. Proteína de Fusão de SEQ. N° 28**

**[00340]** A proteína de SEQ. N° 28 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 227 amino ácidos e a massa de 25,5 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL116 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a viscotoxina A3 (VtA3) de peptídeo de 46 amino ácidos (SEQ. N° 53) fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00341]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio

(a), existe um local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de uroquinase (RVVR) e ligante estérico (GGSGG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 53)-MMP-UROQUINA-LIGANTE6-(TRAIL 116 A 281)

**[00342]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 28 e SEQ. N° 84, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00343]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 28 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 84. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 29. Proteína de Fusão de SEQ. N° 29**

**[00344]** A proteína de SEQ. N° 29 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 224 amino ácidos e a massa de 24,9 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é a viscotoxina A3 (VtA3) de peptídeo de 46 amino ácidos (SEQ. N° 53) fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00345]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe um ligante estérico (GGSGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se

segue: (TRAIL121 a 281)-LIGANTE7-MMP-UROQUINA-(SEQ. N° 53)

**[00346]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 29 e SEQ. N° 85, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00347]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 29 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 85. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

### **Exemplo 30. Proteína de Fusão de SEQ. N° 30**

**[00348]** A proteína de SEQ. N° 30 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 200 amino ácidos e a massa de 22,5 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o fragmento ativo de 33 amino ácidos de perforina humana (SEQ. N° 54) fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00349]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b) está a sequência de ligante estérico incorporado (GGGGSG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 a 281)-LIGANTE8-(SEQ. N° 54)

**[00350]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 30 e SEQ. N° 86, conforme mostrado na Listagem de Sequência

anexa.

**[00351]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 30 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 86. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

**Exemplo 31. Proteína de Fusão de SEQ. N° 31**

**[00352]** A proteína de SEQ. N° 31 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 210 amino ácidos e a massa de 23,5 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o fragmento ativo de 33 amino ácidos de perforina humana (SEQ. N° 54) fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00353]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGGSG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de uroquinase (RVVR) E o local de clivagem de protease (PLGLAG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 a 281)-LIGANTE8-UROQUINA-MMP-(SEQ. N° 54)

**[00354]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 31 e SEQ. N° 87, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00355]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 31 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 87. Um

plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral B, utilizando estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) ou Tuner (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

### **Exemplo 32. Proteína de Fusão de SEQ. N° 32**

**[00356]** A proteína de SEQ. N° 32 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 436 amino ácidos e a massa de 48 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL116 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efector é a paraesporina-2 de 251 amino ácidos a partir de *Bacillus thuringensis* (SEQ. N° 55) fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00357]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe um local de clivagem de uroquinase (RVVR) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e ligante estérico (GSGGGSGGG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 55)-UROQUINA-MMP-LIGANTE11-(TRAIL 116 A 281)

**[00358]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 32 e SEQ. N° 88, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00359]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 32 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 88. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi

executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral B, utilizando estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) ou Tuner (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

**Exemplo 33. Proteína de Fusão de SEQ. N° 33**

**[00360]** A proteína de SEQ. N° 33 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 215 amino ácidos e a massa de 24,3 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo de fusão de 32 amino ácidos compreendendo inibidor de EGF e peptídeo lítico sintético (SEQ. N° 56) fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00361]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe o ligante estérico (G) incorporado sequencialmente, ligante estérico (CAACAAAC), ligante estérico (GGG), o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG) e local de clivagem de uroquinase (RVVR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 a 281)-LIGANTE15-LIGANTE12-LIGANTE2-MMP-UROQUINA-(SEQ. N° 56)

**[00362]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 33 e SEQ. N° 89, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00363]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 33 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 89. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi

executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa com etiqueta de histidina.

**Exemplo 34. Proteína de Fusão de SEQ. N° 91**

**[00364]** A proteína de SEQ. N° 91 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 223 amino ácidos e a massa de 25,2 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é peptídeo de fusão de 39 amino ácidos compreendendo inibidor de PDGFR e peptídeo lítico sintético (SEQ. N° 125) fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00365]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe um local de clivagem de uroquinase (RVVR) incorporado sequencialmente e o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), ligante estérico (GG), ligante estérico (CAAACAAC) e ligante estérico (SGG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 125)-UROQUINA-MMP-LIGANTE1-LIGANTE13-LIGANTE16-(TRAIL121 A 281)

**[00366]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 91 e SEQ. N° 108, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00367]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 91 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 108. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos

acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

**Exemplo 35. Proteína de Fusão de SEQ. N° 92**

**[00368]** A proteína de SEQ. N° 92 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 223 amino ácidos e a massa de 25,6 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL95 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico sintético de fusão de 14 amino ácidos (SEQ. N° 41) fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00369]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe domínio de transporte de poliarginina (RRRRRRR) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de furina (RKRR), ligante estérico (GGG) e ligante estérico (CAAACAAC). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 41)-TRANS2-FURINA-LIGANTE2-LIGANTE13-(TRAIL 95 A 281)

**[00370]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 92 e SEQ. N° 109, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00371]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 92 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 109. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese



de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

**Exemplo 36. Proteína de Fusão de SEQ. N° 93**

**[00372]** A proteína de SEQ. N° 93 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 232 amino ácidos e a massa de 26,7 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL95 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo de lítico sintético de fusão de 14 amino ácidos (SEQ. N° 41), fixado ao terminal N do domínio (a).

**[00373]** Adicionalmente, entre o domínio (b) e o domínio (a), existe um domínio de transporte de poliarginina (RRRRRRR) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de furina (RKRR), local de clivagem de furina nativa (HRQPRGWEQ), ligante estérico (GGG), e ligante estérico (CAAACAAC). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (SEQ. N° 41)-TRANS2-FURINA-FUR.NAT-LIGANTE2-LIGANTE13-(TRAIL95 A 281)

**[00374]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 93 e SEQ. N° 110, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00375]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 93 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 110. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

**Exemplo 37. Proteína de Fusão de SEQ. N° 94**

[00376] A proteína de SEQ. N° 94 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 207 amino ácidos e a massa de 23 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo de lítico sintético de fusão de 14 amino ácidos (SEQ. N° 41), fixado ao terminal C do domínio (a).

[00377] Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR), domínio de transporte (YARAAARQARA), e ligante estérico (GG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-TRANS4-LIGANTE1-(SEQ. N° 41)

[00378] A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 94 e SEQ. N° 111, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

[00379] A sequência de amino ácido SEQ. N° 94 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 111. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

**Exemplo 38. Proteína de Fusão de SEQ. N° 95**

[00380] A proteína de SEQ. N° 95 é uma proteína de fusão

que tem a extensão de 218 amino ácidos e a massa de 24,4 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o análogo de pleurocidina de 25 amino ácidos (SEQ. N° 126), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00381]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR), domínio de transporte (YARAAARQARA) e ligante estérico (GG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-TRANS4-LIGANTE1-(SEQ. N° 126)

**[00382]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 95 e SEQ. N° 112, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00383]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 95 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 112. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner (DE3)* da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 39. Proteína de Fusão de SEQ. N° 96**

**[00384]** A proteína de SEQ. N° 96 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 219 amino ácidos e a massa de 24,5 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281,

e o domínio (b) do peptídeo efetor é o análogo de pleurocidina de 26 amino ácidos (SEQ. N° 127), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00385]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR), domínio de transporte (YARAAARQARA) e ligante estérico (GG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-TRANS4-LIGANTE1-(SEQ. N° 127)

**[00386]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 96 e SEQ. N° 113, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00387]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 96 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 113. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 40. Proteína de Fusão de SEQ. N° 97**

**[00388]** A proteína de SEQ. N° 97 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 212 amino ácidos e a massa de 23,9 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico sintético de 17 amino ácidos (SEQ. N° 128), fixado ao

terminal C do domínio (a).

**[00389]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR), domínio de transporte (THRPPMWSPVWP) e ligante estérico (GGG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-TRANS5-LIGANTE2-(SEQ. N° 127)

**[00390]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 97 e SEQ. N° 114, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00391]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 97 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 114. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 41. Proteína de Fusão de SEQ. N° 98**

**[00392]** A proteína de SEQ. N° 98 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 207 amino ácidos e a massa de 23,3 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico sintético de 14 amino ácidos (SEQ. N° 41), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00393]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio

(b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR), domínio de transporte (YGRKKRRQRRR) e ligante estérico (GG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-TRANS6-LIGANTE1-(SEQ. N° 41)

**[00394]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 98 e SEQ. N° 115, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00395]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 98 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 115. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 42 Proteína de Fusão de SEQ. N° 99**

**[00396]** A proteína de SEQ. N° 99 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 207 amino ácidos e a massa de 24 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo sintético de 31 amino ácidos (SEQ. N° 129), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00397]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease

(PLGLAG), e local de clivagem de uroquinase (RVVR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-(SEQ. N° 129)

**[00398]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 99 e SEQ. N° 116, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00399]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 99 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 116. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 43. Proteína de Fusão de SEQ. N° 100**

**[00400]** A proteína de SEQ. N° 100 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 210 amino ácidos e a massa de 24,1 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo sintético de 17 amino ácidos (SEQ. N° 130), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00401]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), e local de clivagem de uroquinase (RVVR), domínio de transporte (YGRKKRRQRRR) e ligante estérico (GG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se

segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-TRANS6-LIGANTE1-(SEQ. N° 130)

**[00402]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 100 e SEQ. N° 117, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00403]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 100 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 117. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 44. Proteína de Fusão de SEQ. N° 101**

**[00404]** A proteína de SEQ. N° 101 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 211 amino ácidos e a massa de 23,7 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico sintético de 29 amino ácidos (SEQ. N° 131), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00405]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), e local de clivagem de uroquinase (RVVR) e ligante estérico (GGG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-LIGANTE1-(SEQ. N° 131)

**[00406]** A sequência de amino ácido e a sequência de



codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 101 e SEQ. N° 118, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00407]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 101 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 118. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

#### **Exemplo 45. Proteína de Fusão de SEQ. N° 102**

**[00408]** A proteína de SEQ. N° 102 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 234 amino ácidos e a massa de 26,2 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e dois domínios (b) do peptídeo efetor são o peptídeo de melitina de 25 amino ácidos (SEQ. N° 132) e peptídeo lítico sintético de 14 amino ácidos (SEQ. N° 41), fixados ao terminal C do domínio (a).

**[00409]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR), e ligante estérico (GG). Adicionalmente, um ligante estérico (GGGGS) é incorporado entre dois domínios efetores. Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-LIGANTE1-(SEQ. N° 132)-LIGANTE4-(SEQ. N° 41)

**[00410]** A sequência de amino ácido e a sequência de

codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 102 e SEQ. N° 119, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00411]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 102 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 119. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

**Exemplo 46. Proteína de Fusão de SEQ. N° 103**

**[00412]** A proteína de SEQ. N° 103 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 205 amino ácidos e a massa de 23 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo de melitina de 25 amino ácidos (SEQ. N° 132), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00413]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), e local de clivagem de uroquinase (RVVR. Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-(SEQ. N° 132)

**[00414]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 103 e SEQ. N° 120, conforme mostrado na Listagem de Sequência

anexa.

**[00415]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 103 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 120. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

**Exemplo 47. Proteína de Fusão de SEQ. N° 104**

**[00416]** A proteína de SEQ. N° 104 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 215 amino ácidos e a massa de 24,5 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo de melitina de 25 amino ácidos (SEQ. N° 132), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00417]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR), domínio de transporte de poliarginina (RRRRRRRR) e ligante estérico (GG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-TRANS3-LIGANTE1-(SEQ. N° 132)

**[00418]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 104 e SEQ. N° 121, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00419]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 104 da

estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 121. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

**Exemplo 48. Proteína de Fusão de SEQ. N° 105**

**[00420]** A proteína de SEQ. N° 105 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 215 amino ácidos e a massa de 24,4 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo de melitina de 25 amino ácidos (SEQ. N° 132), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00421]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR), e ligante estérico (GG). Então, ao terminal C do domínio (b) é fixado um domínio de transporte de poliarginina (RRRRRRRR), formando um fragmento de terminal C da construção inteira. Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-LIGANTE1-(SEQ. N° 132)-TRANS3

**[00422]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códon otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 105 e SEQ. N° 122, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00423]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 105 da

estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 122. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

**Exemplo 49. Proteína de Fusão de SEQ. N° 106**

**[00424]** A proteína de SEQ. N° 106 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 203 amino ácidos e a massa de 23,3 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico sintético de 15 amino ácidos (SEQ. N° 35), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00425]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR) e o domínio de transporte de poliarginina (RRRRRRRR). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-TRANS3-(SEQ. N° 35)

**[00426]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 106 e SEQ. N° 123, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00427]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 106 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 123. Um

plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

**Exemplo 50. Proteína de Fusão de SEQ. N° 107**

**[00428]** A proteína de SEQ. N° 107 é uma proteína de fusão que tem a extensão de 208 amino ácidos e a massa de 23,7 kDa, em que o domínio (a) é a sequência de TRAIL121 a 281, e o domínio (b) do peptídeo efetor é o peptídeo lítico sintético de 15 amino ácidos (SEQ. N° 35), fixado ao terminal C do domínio (a).

**[00429]** Adicionalmente, entre o domínio (a) e o domínio (b), existe um ligante estérico (GGGSGGGG) incorporado sequencialmente, o local de clivagem de metaloprotease (PLGLAG), local de clivagem de uroquinase (RVVR), domínio de transporte (YGRKKRRQRRR) e ligante estérico (GG). Então, a estrutura da proteína de fusão da invenção é conforme se segue: (TRAIL121 A 281)-LIGANTE10-MMP-UROQUINA-TRANS6-LIGANTE1-(SEQ. N° 35)

**[00430]** A sequência de amino ácido e a sequência de codificação de DNA compreendendo códons otimizados para expressão em *E. coli* são, respectivamente, SEQ. N° 107 e SEQ. N° 124, conforme mostrado na Listagem de Sequência anexa.

**[00431]** A sequência de amino ácido SEQ. N° 107 da estrutura descrita acima foi utilizada como um modelo para gerar a sua sequência de codificação de DNA SEQ. N° 124. Um plasmídeo contendo a sequência de codificação de DNA foi gerado e a superexpressão da proteína de fusão foi

executada de acordo com os procedimentos gerais descritos acima. A superexpressão foi realizada de acordo com o procedimento geral A, utilizando estirpe de *E. coli Tuner* (DE3) da Novagen. A proteína foi separada por eletroforese de acordo com o procedimento geral descrito acima. A proteína foi expressa sem etiqueta de histidina.

**Exemplo 51. Exame de atividade anti-tumor das proteínas de fusão**

**[00432]** Exame da atividade anti-tumor das proteínas de fusão foi executado in vitro em um ensaio de citotoxicidade em linhas de células de tumor e in vivo em camundongos. Para fins de comparação, a proteína rhTRAIL114 a 281 e placebo foram utilizados.

**[00433]** 1. Medição de dicroísmo circular: determinação de composição de estruturas secundárias das proteínas obtidas

**[00434]** A qualidade das preparações de proteínas de fusão em termos de suas estruturas foi determinada por dicroísmo circular para as proteínas de fusão de Ex. 23, Ex. 11 e Ex. 13.

**[00435]** O dicroísmo circular é utilizado para determinação de estruturas secundárias e conformação de proteínas. O método CD utiliza a atividade ótica das estruturas de proteína, manifestada na rotação do plano de polarização de luz e a aparência de polarização elíptica. O espectro CD de proteínas em ultravioleta (UV) distante provê dados precisos sobre a conformação da cadeia principal de polipeptídeo.

Diálise.

**[00436]** Amostras da proteína a ser analisada, após formulação em um tampão que consiste de 50 mM de Tris-HCl com pH de 8,0, 100 mM de NaCl, 10% de glicerol, 0,1 mM de  $\text{ZnCl}_2$ , 80 mM de sacarose, 5mM de DTT, foram dialisados em

bolsas de diálise (Sigma-Aldrich) com corte de 12 kDa. A diálise foi realizada contra excesso de 100 vezes (v/v) de tampão com relação às preparações de proteína, com agitação por diversas horas a 4°C. Após a diálise ter sido concluída, cada preparação foi centrifugada (25000 rpm., 10 min., 4°C) e os sobrenadantes foram coletados. A concentração de proteína nas amostras então obtidas foi determinada pelo método de Bradford.

**[00437]** A medição de dicroísmo circular para proteínas na faixa de concentração de 0,1 a 2,7 mg/ml foi realizado em espectropolarímetro Jasco J-710, em uma cuveta de quartz com percurso ótico de 0,2 mm ou 1 mm. A medição foi realizada sob o fluxo de nitrogênio a 7 l/min, que permitiu desempenhar a medição na faixa de comprimento de onda a partir de 195 até 250 nm. Os parâmetros da medição: a resolução de espectro de - 1 nm; meia largura do feixe de luz de 1 nm; sensibilidade de 20 mdeg, o tempo médio para um comprimento de onda - 8 s, velocidade de scan de 10 nm/min.

**[00438]** Os espectros obtidos foram analisados numericamente na faixa de 193 a 250 nm utilizando software CDPro. Os pontos para os quais a voltagem no fotomultiplicador excedeu 700 V foram omitidos, devido ao sinal baixo demais em relação ao ruído nessa faixa de comprimento de onda.

**[00439]** Os dados obtidos serviram para cálculos de conteúdo de estruturas secundárias particulares nas proteínas analisadas com uso de software CDPro (Tabela 1).

**[00440]** Tabela 1. Conteúdo das estruturas secundárias nas proteínas analisadas.

Proteína	NRMSD	Hélice	Folha $\beta$	Schift	Desordem
----------	-------	--------	---------------	--------	----------



	(Exp-Cal)	$\alpha$			
Ex. 23	0.149	3.7%	42.0%	21.1%	33.2%
Ex. 11	0.079	25.1%	22.7%	21.2%	30.9%
Ex. 13	0.047	15.0%	32.2%	20.6%	32.2%
hTRAIL*		1.94%	50.97%	7.74%	39.35%
hTRAIL	0.389	4.9%	33.7%	23.1%	38.3%

\* valor obtido com base na estrutura cristalina 1D4V

\*\* valores obtidos com base nas estruturas cristalinas 1lKQ, 1R4Q, 1ABR, 3PX8.

**[00441]** A molécula de controle (rhTRAIL114 a 281) mostra a característica do espectro CD para as proteínas com estruturas predominantemente do tipo folha  $\beta$  (delineou precisamente a elipticidade mínima no comprimento de onda de 220 nm). Isso confirma o cálculo dos componentes da estrutura secundária, sugerindo um número secundário dos elementos de hélice  $\alpha$ .

**[00442]** O resultado obtido é também consistente com os dados a partir da estrutura de cristal da proteína hTRAIL, e é característico para a proteína de fusão da invenção de Ex. 23, em que elementos beta constituem 42% da sua estrutura. Para proteínas de Ex. 11 e Ex. 13, foi observado conteúdo superior de alfa-hélice (adicional mínimo do espectro no comprimento de onda de 208 nm). Isso é devido à presença nas construções de motivos KLAKLAK os quais têm forte caráter anfifático e formam estruturas tipo alfa-helicoidal. Infelizmente, devido à baixa estabilidade de proteínas a partir de Ex. 23, Ex. 11 e Ex. 13 no tampão para as medições de CD e baixas concentrações de preparações analisadas, seus espectros são caracterizados por um alto nível de ruído e com baixa resolução. Portanto, eles podem não refletir inteiramente a situação atual, e

somente sugerir o resultado.

**[00443]**     2. Testes em linhas celulares in vitro

**[00444]**     Linhas celulares

**[00445]**     As linhas celulares obtidas a partir de ATCC e CLS, e depois propagadas e depositadas no Laboratório de Adamed do Banco de Biologia de Linha Celular. Durante o experimento, as células foram rotineiramente checadas quanto à presença de Micoplasma por técnica PCR utilizando o kit de detecção de PCR de Micoplasma Venor®GeM (Minerva Biolabs, Berlim, Alemanha). As culturas foram mantidas nas condições padrão: 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> (no caso de DMEM - 10% de CO<sub>2</sub>), e 85% de umidade relativa. As linhas de célula particular foram cultivadas em meio adequado conforme recomendado por ATCC.

**[00446]**     Tabela 2. Células aderentes

Linha Celular	Tipo de Câncer	Meio	Número de células por poço (centenas)
Colo 205 ATCC #CCL-222	<i>Câncer colo-retal humano</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	5
HT-29 ATCC # CCL-2	<i>Câncer colo-retal humano</i>	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	5
DU-145 ATCC # HTB-81	<i>Câncer de próstata humano</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	3
PC-3 ATCC # CRL-1435	<i>Câncer de próstata humano</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4
MCF-7 ATCC #HTB-22	<i>Câncer de mama humano</i>	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4.5
MDA-MB-231 ATCC # HTB-26	<i>câncer de mama humano</i>	DMEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4.5
MDA-MB-435s ATCC# HTB-129	<i>câncer de mama humano</i>	DMEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4

UM-UC-3 ATCC # CLR-1749	<i>câncer de bexiga humano</i>	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	3.5
SW780 ATCC #CRL-2169	<i>câncer de bexiga humano</i>	DMEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	3
SW620 ATCC #CCL-227	<i>câncer colorectal humano</i>	DMEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	5
BxPC-3 ATCC #CRL-1687	<i>câncer pancreático humano</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4.5
SK-OV-3 ATCC # HTB-77	<i>câncer ovariano humano</i>	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4
NIH: OVCAR-3 ATCC <b>#HTB-161</b>	<i>câncer ovariano humano</i>	RPMI + 20% de FBS + 0,01mg/ml insulina + penicilina + estreptomicina	7
HepG2 ATCC # HB-8065	<i>Hepatoma de fígado humano</i>	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	7
293 ATCC # CLR-1573	<i>Células dos rins embrionárias Humanas</i>	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4
ACHN ATCC #CCL-222	<i>câncer dos rins humano</i>	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4
CAKI 1 ATCC #HTB-46	<i>câncer dos rins humano</i>	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	3.5
CAKI 2 ATCC # HTB-47	<i>câncer dos rins humano</i>	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	3.5
NCI- H69AR ATCC #CRL-11351	<i>Câncer de pulmão de célula pequena</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	10
HT144 ATCC # HTB-63	<i>Células de melanoma humano</i>	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	7
NCI-H460 ATCC #HTB-177	<i>câncer de pulmão humano</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	2.5
A549 ATCC # CCL-185	<i>câncer de pulmão humano</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	2.5
MES-SA ATCC # CRL-1976	<i>sarcoma de útero humano</i>	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	3.5

MES-SA/Dx5 ATCC #CRL-1977	sarcoma de útero humano resistente a drogas múltiplas	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	4
MES-SA/Mx2 ATCC #CRL-2274	Sarcoma uterino humano	Waymouth's MB 752/1 + McCoy's (1 : 1) + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	4
SK-MES-1 ATCC # HTB- 58	<i>câncer de pulmão humano</i>	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	5
HCT-116 ATCC # CCL-247	<i>câncer colorectal humano</i>	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	3
MCF10A ATCC # CRL-10317	Células epiteliais mamárias	DMEM:F12 + 5% de plasma de cavalo + 0.5 µg/ml de hidrocortisona + 10 µg/ml de insulina + 20 ng/ml de EGF de fator de crescimento	5
Panc-1 CLS 330228	<i>câncer pancreático humano</i>	DMEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	5
Panc03.27 ATCC # CRL-2549	<i>câncer pancreático humano</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	5
PLC/PRF/5 CLS 330315	<i>Hepatoma de fígado humano</i>	DMEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	5
LNCaP ATCC # CRL-1740	<i>câncer de próstata humano</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	4.5
SK-Hep-1 CLS300334	<i>Hepatoma de fígado humano</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	10
A498 CLS 300113	<i>câncer dos rins humano</i>	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	3
HT1080 ATCC #CCL-121	fibrosarcoma humano	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomomicina	3
HUV-EC-C ATCC # CRL-1730	Células endoteliais umbilicais humanas	M199 + 20% de FBS + penicilina + 0,05 mg/ml de ECGS + 0,1 mg/ml de heparina + penicilina + estreptomomicina	8.5

[00447]

Tabela 3. Células não aderentes:

Linha Celular	Tipo de Câncer	Meio	Número de células por poço (centenas)
NCI-H69 ATCC # HTB-119	Câncer de pulmão de célula pequena	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	22
Jurkat A3 ATCC #CRL-2570	<i>leucemia humana</i>	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	10
HL60 ATCC # CCL-240	<i>Leucemia humana</i>	RPMI + 20% de FBS + penicilina + estreptomicina	10
CCRF-CEM ATCC # CCL-119	<i>Leucemia humana</i>	RPMI + 20% de FBS + penicilina + estreptomicina	10

**[00448]**      Teste de citotoxicidade de MTT

**[00449]**      O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico utilizado para medir a proliferação, viabilidade e citotoxicidade de células. Ele consiste na decomposição de um MTT de sal de tetrazolium amarelo (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-brometo de difeniltetrazolium) até o formazano de matriz roxa insolúvel em água pela reductase de succinata-tetrazolia de enzima mitocondrial 1. A redução de MTT somente ocorre em células vivas. A análise de dados consiste em determinar a concentração de IC<sub>50</sub> da proteína (em ng/ml), na qual a redução de 50% no número de células ocorre na população tratada comparado com as células de controle. Os resultados foram analisados utilizando software GraphPad Prism 5.0. O teste foi realizado de acordo com as descrições da literatura (Celis, JE, (1998). Cell Biology, a Laboratory Handbook, second edition, Academic Press, San Diego; Yang, Y., Koh, LW, Tsai, JH., (2004); Involvement of viral and chemical factors with oral cancer in Taiwan, Jpn J Clin Oncol, 34 (4), 176 a 183).

**[00450]**      O meio de cultura celular foi diluído em uma densidade definida ( $10^4$  a  $10^5$  de células por 100 µl). Depois, 100 µl de suspensão celular adequadamente diluída

foi aplicada em uma placa com 96 orifícios em três exemplares. Então, as células preparadas foram incubadas por 24 horas a 37°C em 5% ou 10% de CO<sub>2</sub>, dependendo do meio utilizado, e depois para as células (em 100 µl de meio) adicionais 100 µl do meio contendo diversas concentrações de proteínas testadas foram adicionadas. Após a incubação das células com proteínas testadas durante o período das próximas 72 horas, que é equivalente a 3 a 4 vezes de divisão celular, o meio com a proteína de teste foi adicionado com 20 ml de solução de funcionamento de MTT [5 mg/ml], e incubação foi continuada por 3 horas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Depois, o meio com solução de MTT foi removido, e cristais de formazano foram dissolvidos adicionando 100 µl de DMSO. Após agitar, a absorvância foi medida a 570 nm (filtro de referência de 690 nm).

**[00451]**     Teste de citotoxicidade de EZ4U

**[00452]**     O teste de EZ4U (Biomedica) foi utilizado para testar a atividade citotóxica das proteínas em linhas celulares não aderentes. O teste é uma modificação do método MTT, em que formazano formado na redução de sal de tetrazolia é aqua-solúvel. O estudo de viabilidade celular foi realizado após incubação contínua de 72 horas das células com proteína (sete concentrações de proteína, cada em três exemplares). Nessa base os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados (como uma média de dois experimentos independentes) utilizando o software GraphPad Prism 5. As células de controle foram incubadas com o solvente somente.

**[00453]**     Os resultados de testes de citotoxicidade *in vitro* são resumidas como valores de IC<sub>50</sub> (ng/ml), que corresponde à concentração de proteína na qual o efeito citotóxico de proteínas de fusão é observado ao nível de 50% com relação às células de controle tratados somente com

solvente. Cada experimento representa o valor médio de pelo menos dois experimentos independentes realizados em três exemplares. Como um critério de falta de atividade de preparações de proteína, o limite de IC<sub>50</sub> de 2000 ng/ml foi adotado. As proteínas de fusão com um valor de IC<sub>50</sub> acima de 2000 foram consideradas inativas.

**[00454]** As células selecionadas para esse teste incluíram as linhas celulares de tumor que são naturalmente resistentes à proteína TRAIL (o critério de resistência à TRAIL: IC<sub>50</sub> para proteína TRAIL > 2000), bem como linhas celulares de tumor sensíveis à proteína TRAIL e resistente à linha de doxorubicina MES-SA/DX5 como uma linha de câncer resistente aos medicamentos anticâncer convencionais.

**[00455]** A linha celular HUVEC indiferenciada foi utilizada como uma linha celular de controle saudável para avaliação do efeito/toxicidade das proteínas de fusão em células não cancerígenas.

**[00456]** Os resultados obtidos confirmaram a possibilidade de superar a resistência das linhas celulares à TRAIL por administração de determinadas proteínas de fusão da invenção às células naturalmente resistentes à TRAIL. Quando as proteínas de fusão da invenção foram administradas às células sensíveis à TRAIL, em alguns casos, uma potencialização clara e forte da potência de ação foi observada, a qual foi manifestada em valores de IC<sub>50</sub> reduzidos da proteína de fusão comparado com o IC<sub>50</sub> para a TRAIL sozinha. Ademais, a atividade citotóxica da proteína de fusão da invenção nas células resistentes ao medicamento anticâncer clássico doxorubicina foi obtido, e em alguns casos, é mais forte do que a atividade de TRAIL sozinha.

**[00457]** Os valores de IC<sub>50</sub> acima de 2000 obtidos para as

linhas celulares não cancerígenas mostraram a ausência de efeitos tóxicos associados com o uso de proteínas da invenção para células saudáveis, que indicam baixo potencial toxicidade sistêmica da proteína.

**[00458]** Determinação de atividade citotóxica de preparações de proteína selecionadas contra painel estendido de linhas celulares de tumor

**[00459]** A Tabela 4 apresenta os resultados dos testes de atividade citotóxica *in vitro* para proteínas de fusão selecionadas da invenção contra um painel amplo de células de tumor a partir de diferentes órgãos, que corresponde à ampla faixa dos cânceres mais comuns.

**[00460]** Os resultados experimentais são apresentados como um valor principal  $\pm$  desvio padrão (SD). Todos os cálculos e gráficos foram preparados utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

**[00461]** Os valores de  $IC_{50}$  confirmam alta atividade citotóxica de proteínas de fusão e então, sua utilidade potencial na tratamento de câncer.









Tabela 4c. Atividade citotóxica das proteínas de fusão da invenção

Proteína	Incubação contínua de preparações com células acima de 72 horas (MTT de teste, ng/ml)											
	SW620		Panc-1		PLC/PRF/5		HT-29		Caki-1		SK-HEP-1	
	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD
TRAIL 95 a 281	>2000		>2000		>2000		>2000		13.42	2.16	>2000	
Ex. 11 <sup>b</sup>	325	24	10.87	1.8	46.4	20	893		11.57		75.1	11.3
Ex. 16 <sup>b</sup>	1688	917	0.68	0.93	2.89	2.02	1063	480	3.29	1.44	4.27	2.36
Ex. 13 <sup>b</sup>	4.42		26		5,8							
	Caki-2		SK-OV-3		BxPC-3		HT-144		OV-CAR-3		HT-1080	
	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD
TRAIL 95 a 281	>2000		>2000		60.6	22.8	1134	375	963	144	>2000	
Ex. 16 <sup>b</sup>	3.54	0.52	161.2	1.8	0.55	0.12	0.13	0.05	0.12		1025	395
	MES-SA/Mx2		Colo205		MCF-7		MDA-MB-231		MDA-MB-435S		ACHN	
	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD	IC <sub>50</sub>	±SD
TRAIL 95 a 281	38.95	6.14	59.02	21.16	>2000		>2000		>2000		>2000	
Ex. 16 <sup>b</sup>	0.0001		0.48	0.65	1.74	0.51	1.71	1.19	0.86	1.08	0.38	0.32



**[00462]**     3. Eficácia Antitumor de proteínas de fusão *in vivo* em xenotransplantes

**[00463]**     A atividade antitumor de preparações de proteína foram testadas em um modelo de camundongo de câncer de cólon humano Colo 205 e HCT-116, câncer de pulmão humano A549 e NCI-H460-Luc, câncer de próstata humano PC-3, câncer de pâncreas humano Panc-1 e MIA PaCa-2, câncer de fígado humano PCL/PRF/5 e HepG2, e sarcoma uterino MES resistente a drogas múltiplas humanas -SA.Dx5.

**[00464]**     Células

**[00465]**     As células de câncer de pulmão humano A549 e NCI-H460-Luc2 e câncer de próstata humano PC3 foram mantidos em meio de RPMI1640 (HyClone, Logan, UT, E.U.A.) suplementado com 10% de soro de feto de bezerro e 2 mM de glutamina.

**[00466]**     As células de câncer de cólon humano Colo 205 foram mantidas em meio de RPMI1640 (HyClone, Logan, UT, E.U.A.) (opcionalmente misturadas na razão de 1:1 com Opto-MEM (Invitrogen, Cat. No. 22600-134) suplementada com 10% de soro de feto de bezerro e 2 mM de glutamina.

**[00467]**     As células de câncer de pâncreas humano PANC-1, câncer de fígado humano PLC/PRF/5, câncer de pâncreas MIA PaCa-2 e câncer de cólo humano SW-620 foram mantidas em meio de DMEM (HyClone, Logan, UT, E.U.A.) suplementado com 10% de soro de feto de bezerro e 2 mM de glutamina.

**[00468]**     As células de câncer de cólon humano HCT-116 foram mantidas em meio de McCoy (HyClone, Logan, UT, E.U.A.) suplementado com 10% de soro de feto de bezerro e 2 mM de glutamina.

**[00469]**     As células de sarcoma uterino humano resistente a drogas múltiplas MES-SA.Dx5 foram mantidas em meio de

McCoy (HyClone, Logan, UT, E.U.A.) suplementado com 10% de soro de feto de bezerro e 2 mM de glutamina, e 1  $\mu$ M de cloridrato de doxorubicina (Sigma, Cat. No. D1515-10MG). Três dias antes da implantação das células, as células foram cultivadas em meio sem doxorubicina.

**[00470]** As células de câncer de fígado humano HepG2 foram mantidas em meio de MEM (HyClone, Logan, UT, E.U.A) suplementadas com 10% de soro de feto de bezerro e 2 mM de glutamina. No dia do enxerto em camundongos, as células foram desanexadas do suporte lavando as células com tripsina (Invitrogen), depois as células foram centrifugadas a 1300 rpm, 4°C, 8 min., suspensas em tampão de HBSS (meio de Hanks).

**[00471]** Camundongos

**[00472]** Exame de atividade antitumor de proteínas da invenção foi realizado em camundongos (Cby.Cg-foxn1(nu)/J) (modelo de câncer de pulmão) com 4 a 6 semanas de vida ou com 9 a 10 semanas de vida (modelo de câncer de próstata) obtidos a partir de Centrum Medycyny Doświadczalnej in Białystok, camundongos fêmea Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>h</sup> com 4 a 5 semanas de vida obtidos a partir de Charles River Germany. Os camundongos foram mantidos sob condições específicas sem patógenos com livre acesso à comida e à água desmineralizada (*ad libitum*). Todos os experimentos em animais foram executados de acordo com as diretrizes: "Interdisciplinary Principles and Guidelines for the Use of Animals in Research, Marketing and Education" emitida pelo Comitê Ad Hoc da The New York Academy of Sciences sobre Pesquisas em Animais e foram aprovados pelo IV Comitê de Ética Local sobre Experimentos em Animais em Varsóvia (Nº 71/2009).

**[00473]** O curso e avaliação dos experimentos

**[00474]** O tamanho do tumor foi medido utilizando compasso eletrônico, o volume do tumor foi calculado utilizando a fórmula:  $(a^2 \times b)/2$ , em que a = diagonal mais curto do tumor (mm) e b = diagonal mais longo do tumor (mm). A inibição do crescimento do tumor foi calculada utilizando a fórmula:

$$\text{TGI [\%]} (\text{inibição do crescimento do tumor}) = (\text{WT/WC}) \times 100 - 100\%$$

em que WT é a média do volume do tumor no grupo de tratamento, e WC é o volume médio de tumor no grupo de controle.

**[00475]** Os resultados experimentais são apresentados como um valor principal  $\pm$  desvio padrão (SD). Todos os cálculos e gráficos foram preparados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

#### Modelo de câncer de Pulmão c

##### Experimento A.

**[00476]** No dia 0 os camundongos Cby.Cg-foxn1(nu)/J foram enxertados subcutaneamente (s.c.) no lado direito com  $5 \times 10^6$  de células A549 suspensas em 0,1 ml da mistura HBSS:Matrigel 4:1 utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). No dia 19 do experimento, os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de  $\sim 75 \text{ mm}^3$  e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> (15 mg/kg), e rhTRAIL114 a 281 (20 mg/kg) como uma comparação e água para injeções como um controle. As preparações foram administradas intravenosamente (i.v) 6 vezes uma vez ao dia a cada segundo dia. No dia 35 do experimento, os camundongos foram sacrificados por disrupção da espinha dorsal.



**[00477]** Os resultados experimentais são mostrados nas Fig. 1 e Fig. 2 como um diagrama de mudanças e inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como a percentagem de controle em camundongos tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> e comparativamente com rhTRAIL114 a 281.

**[00478]** Os resultados experimentais apresentado nas Fig. 1 e 2 mostram que administração da proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> causou a inibição do crescimento do tumor A549, com 28% de TGI relativo ao controle no dia 35 do experimento. Para rhTRAIL114 a 281 utilizado como a referência comparativa, um efeito ligeiramente inibitório no crescimento celular do tumor foi obtido relativo ao controle, com TGI ao nível de 0%. Então, as proteínas de fusão da invenção exerceram efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha.

Experimento B.

**[00480]** No dia 0, camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) no lado direito com  $7 \times 10^6$  de células A549 suspensas em 0,1 ml da mistura de HBSS:Matrigel 3:1 utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). No dia 17 do experimento, os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de  $\sim 100\text{--}120 \text{ mm}^3$  e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> (40 mg/kg), e rhTRAIL114 a 281 (20 mg/kg) como uma comparação contra o tampão de formulação (19 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 81 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM de NaCl, 5 mM de glutathiona, 0,1 mM de ZnCl<sub>2</sub>, 10% de glicerol, pH de 7,4) como um controle. As preparações foram administradas intravenosamente (i.v) 6 vezes uma vez ao dia a cada segundo dia. No dia 34 do

experimento, camundongos foram sacrificados por disrupção da espinha dorsal.

**[00481]** Os resultados experimentais são mostrados nas Fig. 3 e Fig. 4 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle em camundongos tratados com proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> e comparativamente a rhTRAIL114 a 281.

**[00482]** Os resultados experimentais apresentados na Fig. 3 e 4 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> causou a inibição do crescimento do tumor A549, com 45% de TGI relativo ao controle no dia 34 do experimento. Para a rhTRAIL114 a 281 utilizada como referência comparativa, um efeito ligeiramente inibitório sobre o crescimento da célula do tumor foi obtido relativo ao controle, com TGI ao nível de 21,8%. Então, a proteína de fusão da invenção exerceu um efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha.

Experimento C.

**[00483]** No dia 0, camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) no lado direito com  $5 \times 10^6$  de células NCI-H460-Luc2 suspensas em 0,1 ml de tampão de HBSS utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). No dia 11 do experimento, os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de ~100-120 mm<sup>3</sup> e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> (40 mg/kg e 30 mg/kg), e rhTRAIL114 a 281 (20 mg/kg) como uma comparação contra o tampão de formulação (19 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 81 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM de NaCl, 5 mM de glutatona, 0,1 mM de ZnCl<sub>2</sub>, 10% de glicerol, pH de 7,4) como um controle. As preparações foram administradas

intravenosamente(i.v) 6 vezes uma vez ao dia a cada segundo dia (no caso de proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> a primeira administração em uma dose de 40 mg/kg e subsequente a 30 mg/kg. No dia 29 do experimento, os camundongos foram sacrificados por disrupção da espinha dorsal.

**[00484]** Os resultados experimentais são mostrados nas Fig. 5 e Fig. 6 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle em camundongos tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> e comparativamente com rhTRAIL114 a 281.

**[00485]** Os resultados experimentais apresentados nas Fig. 5 e 6 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> causou a inibição do crescimento do tumor NCI-H460-Luc2, com 93% de TGI relativo ao controle no dia 29 do experimento. Para a rhTRAIL114 a 281 utilizada como a referência comparativa, um efeito inibitório sobre o crescimento celular foi obtido relativo ao controle, com TGI ao nível de 76%. Então, a proteína de fusão da invenção exerceu efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha.

**[00486]** A proteína de fusão testada não causou efeitos colaterais significativos manifestados por uma diminuição de peso corporal dos camundongos (i.e. menos do que 10% do peso corporal da linha de base). Isso mostra a baixa toxicidade sistêmica da proteína da invenção.

#### Modelo de câncer de Próstata

**[00487]** No dia 0, camundongos Cby.Cg-foxn1(nu)/J foram enxertados subcutaneamente (s.c.) no lado direito com  $5 \times 10^6$  de células PC3 suspensas em 0,18 ml de tampão de HBSS e 0,02 ml de Matrigel utilizando seringa com uma agulha 0,5 x 25 mm (Bogmark). No dia 29 do experimento, os camundongos

foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de  $\sim 90 \text{ mm}^3$  e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> (15 mg/kg) e 0,9% de NaCl como um controle. As preparações foram administradas intravenosamente (i.v) uma vez ao dia por 6 dias. No dia 60 do experimento, os camundongos foram sacrificados por disrupção da espinha dorsal.

**[00488]** Os resultados experimentais são mostrados nas Fig. 7 e Fig. 8 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle em camundongos tratados com a proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup>.

**[00489]** Os resultados experimentais apresentados nas Fig. 7 e 8 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> causou a inibição do crescimento do tumor PC3, com 33% de TGI relativo ao controle no dia 60 do experimento.

**[00490]** A proteína de fusão testada não causou efeitos colaterais significativos manifestados por uma diminuição no peso corporal dos camundongos (i.e. menos do que 10% do peso corporal da linha de base). isso mostra baixa toxicidade sistêmica da proteína da invenção.

#### Modelo de câncer de Pâncreas

##### Experimento em células PANC-1

**[00491]** No dia 0, camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) no lado direito com  $5 \times 10^6$  de células PANC-1 suspensas em 0,1 ml da mistura de HBSS:Matrigel 3:1 utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). No dia 31 do experimento, os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de  $\sim 110 \text{ mm}^3$  e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com

as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> (40 mg/kg), e rhTRAIL114 a 281 (20 mg/kg) como uma comparação contra o tampão de formulação (19 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 81 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM de NaCl, 5 mM de glutathione, 0,1 mM de ZnCl<sub>2</sub>, 10% de glicerol, pH de 7,4) como um controle. As preparações foram administradas intravenosamente (i.v) 6 vezes uma vez ao dia a cada segundo dia. No dia 42 do experimento, os camundongos foram sacrificados por disrupção da espinha dorsal.

**[00492]** Os resultados experimentais são mostrados nas Fig. 9 e Fig. 10 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle em camundongos tratados com proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> e comparativamente com rhTRAIL114 a 281.

**[00493]** Os resultados experimentais apresentados nas Fig. 9 e 10 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> causou a inibição do crescimento do tumor PANC-1, com 32,6% de TGI relativo ao controle no dia 42 do experimento. Para rhTRAIL114 a 281 utilizado como a referência comparativa, um efeito ligeiramente inibitório sobre o crescimento celular foi obtido relativo ao controle, com TGI ao nível de 26%. Então, a proteína de fusão da invenção exerceu efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha.

**[00494]** A proteína de fusão testada não causou efeitos colaterais significativos manifestados por uma diminuição no peso corporal de camundongos (i.e. menos do que 10% do peso corporal de linha de base). Isso mostra a baixa toxicidade sistêmica da proteína da invenção.

#### Experimento B em células MIA PaCa-2

**[00495]** No dia 0, camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) na região do flanco

direito com  $5 \times 10^6$  de células MIA PaCa-2 suspensas em 0,1 ml de 3:1 de mistura de tampão de HBSS:Matrigel utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Quando os tumores atingiram o tamanho de 60 a 398 mm<sup>3</sup> (dia 20), os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de ~ 170 mm<sup>3</sup> e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> (50 mg/kg) e rhTRAIL114 a 281 (50 mg/kg) como uma comparação e gencitabina de composto de referência (Gemzar, Eli Lilly) (50 mg/kg). As preparações foram administradas intravenosamente (*i.v.*) seis vezes a cada segundo dia, a gencitabina foi aplicada intraperitonealmente (*i.p.*) na mesma programação. O grupo de controle recebeu tampão de formulação.

**[00496]** Quando um grupo terapêutico atingiu o tamanho médio de tumor de ~ 1000 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram sacrificados por deslocamento da cervical.

**[00497]** Os resultados experimentais obtidos em camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> contaminados com carcinoma pancreático MIA PaCa-2 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> e comparativamente com rhTRAIL114 a 281 e gencitabina são mostrados na Fig. 19 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e na Figure 20 que mostra a inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle.

**[00498]** Os resultados do experimento apresentados nas Figuras 19 e 20 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> causou a inibição do crescimento do tumor MIA PaCa-2, com 93% de TGI relativo ao controle no dia 61 do experimento. Para a rhTRAIL114 a 281 e gencitabina como referências comparativas, um efeito ligeiramente inibitório sobre o crescimento celular foi

obtido relativo ao controle, com TGI aos níveis de 68% e 42,6%, respectivamente. Então, as proteína de fusão da invenção exerceram efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha e quimioterapia padrão.

#### Modelo de câncer de Cólon

##### Experimento A em células HCT116.

**[00500]** No dia 0, camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) no lado direito com  $5 \times 10^6$  de células HCT116 suspensas em 0,1 ml de tampão de HBSS utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). No dia 18 do experimento, os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de  $\sim 400 \text{ mm}^3$  e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> (35 mg/kg), e rhTRAIL114 a 281 (20 mg/kg) como uma comparação contra o tampão de formulação (5 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 95 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 200 mM de NaCl, 5 mM de glutathione, 0,1 mM de  $\text{ZnCl}_2$ , 10% de glicerol, 80 mM de sacarose, pH de 8,0) como um controle. As preparações foram administradas intravenosamente (i.v) 6 vezes uma vez ao dia a cada segundo dia. No dia 32 do experimento, os camundongos foram sacrificados por disrupção da espinha dorsal.

**[00501]** Os resultados experimentais são mostrados nas Fig. 11 e Fig. 12 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle em camundongos tratados com proteína de fusão da invenção de Ex. 11<sup>a</sup> e comparativamente com rhTRAIL114 a 281.

**[00502]** Os resultados experimentais apresentados na Fig. 11 e 12 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> causou inibição de crescimento de tumor HCT116, com 33,5% de TGI relativo ao controle no dia 32

do experimento. Para a rhTRAIL114 a 281 utilizada como a referência comparativa, um efeito ligeiramente inibitório sobre o crescimento celular foi obtido relativo ao controle, com o TGI ao nível de 5,6%. Então, a proteína de fusão da invenção exerceu efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha.

**[00503]** A proteína de fusão testada não causou efeitos colaterais significativos manifestados por uma diminuição no peso corporal de camundongos (i.e. menos do que 10% do peso corporal de linha de base). Isso mostra a baixa toxicidade sistêmica da proteína da invenção.

#### Experimento A1 em células HCT116

**[00504]** No dia 0, camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) na região do flanco direito com  $5 \times 10^6$  de células HCT116 suspensas em 0,1 ml da 3:1 da mistura de tampão de HBSS:Matrigel utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Quando os tumores atingiram o tamanho de 71 a 432 mm<sup>3</sup> (dia 13), os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de ~ 180 mm<sup>3</sup> e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> (90 mg/kg) e rhTRAIL114 a 281 (65 mg/kg) como uma comparação. As preparações foram administradas intravenosamente (i.v.) seis vezes a cada segundo dia. O grupo de controle recebeu tampão de formulação.

**[00505]** Quando um grupo experimental atingiu o tamanho de tumor médio de ~ 1000 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical.

**[00506]** Os resultados experimentais obtidos em camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> contaminados com câncer de cólon HCT116 tratados com proteína de fusão da invenção de



Ex. 16<sup>b</sup> e comparativamente com rhTRAIL114 a 281 são mostrados na Fig. 21 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e na Figura 22 que mostra a inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle.

**[00507]** Os resultados dos experimentos apresentados nas Figuras 21 e 22 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> causou a inibição do crescimento do tumor HCT116, com 65,8% de TGI relativo ao controle no dia 24 do experimento. Para a rhTRAIL114 a 281 utilizada como a referência comparativa, um efeito ligeiramente inibitório sobre o crescimento celular foi obtido relativo ao controle, com o TGI ao nível de 37,9%. Então, as proteínas de fusão da invenção exerceram o efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha.

#### Experimento B em células SW620

**[00508]** No dia 0, camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) no lado direito com  $5 \times 10^6$  de células SW620 suspensas em 0,1 ml da mistura de HBSS:Matrigel 3:1 utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). No dia 17 do experimento, os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de  $\sim 320 \text{ mm}^3$  e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com a preparação de proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>a</sup> (20 mg/kg) e rhTRAIL114 a 281 (30 mg/kg) como uma comparação contra o tampão de formulação (19 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 81 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM de NaCl, 5 mM de glutathiona, 0,1 mM de  $\text{ZnCl}_2$ , 10% de glicerol, pH de 7,4) como um controle. As preparações foram administradas intravenosamente (i.v) 6 vezes uma vez ao dia a cada segundo dia. No dia 31 do experimento, os camundongos foram sacrificados por interrupção da espinha dorsal.

**[00509]** Os resultados experimentais em camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> contaminados com SW620 tratados com proteína de fusão da invenção de Ex.16<sup>a</sup> e comparativamente com rhTRAIL114 a 281 são mostrados na Fig. 13 e Fig. 14 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle.

**[00510]** Os resultados experimentais apresentados na Fig. 13 e 14 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex.16<sup>a</sup> causou a inibição de crescimento do tumor SW620, com TGI igual a 25% comparado ao controle no dia 31 do experimento. Para a rhTRAIL114 a 281 utilizada como a referência comparativa, nenhum efeito inibitório sobre o crescimento celular foi obtido relativo ao controle, com o TGI ao nível de -9%. Então, as proteínas de fusão da invenção exerceram efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha.

**[00511]** A proteína de fusão testada não causou efeitos colaterais significativos manifestados por uma diminuição no peso corporal de camundongos (i.e. menos do que 10% do peso corporal de linha de base). Isso mostra a baixa toxicidade sistêmica da proteína da invenção.

#### Experimento C em células Colo205

**[00512]** No dia 0, os camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) no lado direito com  $5 \times 10^6$  de células Colo205 suspensas em 0,1 ml de tampão de HBSS utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). No dia 13 do experimento, os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de  $\sim 115 \text{ mm}^3$  e transferidos para grupos de tratamento.

**[00513]** Os grupos de tratamento foram administrados com as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex.16<sup>a</sup> (30 mg/kg), e rhTRAIL114 a 281 (30 mg/kg) como uma

comparação contra o tampão de formulação (19 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 81 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM de  $\text{NaCl}$ , 5 mM de glutathiona, 0,1 mM de  $\text{ZnCl}_2$ , 10% de glicerol, pH de 7,4) como um controle. As preparações foram administradas intravenosamente (i.v) 6 vezes uma vez ao dia a cada segundo dia. No dia 33 do experimento, os camundongos foram sacrificados por disrupção da espinha dorsal.

**[00514]** Os resultados experimentais são mostrados nas Fig. 15 e Fig. 16 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle.

**[00515]** Os resultados experimentais apresentados nas Fig. 15 e 16 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex.16<sup>a</sup> causou a inibição do crescimento do tumor Colo205, com o TGI igual a 80% relativo ao controle no dia 33 do experimento. Para a rhTRAIL114 a 281 utilizada como a referência comparativa, um efeito ligeiramente inibitório sobre o crescimento celular foi obtido relativo ao controle, com TGI ao nível de 18,8%. Então, as proteínas de fusão da invenção exerceram efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha.

**[00516]** A proteína de fusão testada não causou efeitos colaterais significativos manifestados por uma diminuição no peso corporal de camundongos (i.e. menos do que 10% do peso corporal de linha de base). Isso mostra a baixa toxicidade sistêmica da proteína da invenção.

#### Modelo de sarcoma uterino resistente a drogas múltiplas

**[00517]** No dia 0, camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) no lado direito com  $7 \times 10^6$  de células MES-SA/Dx5 suspensas em 0,1 ml da mistura de HBSS:Matrigel 10:1 utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). No dia 19 do experimento, os camundongos

foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de  $\sim 180 \text{ mm}^3$  e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com a preparação de proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> (30 mg/kg) e rhTRAIL114 a 281 (10 mg/kg) como uma comparação contra o tampão de formulação (19 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 81 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM de NaCl, 5 mM de glutathiona, 0,1 mM de  $\text{ZnCl}_2$ , 10% de glicerol, pH de 7,4) como um controle. As preparações foram administradas intravenosamente (*i.v.*) 6 vezes uma vez ao dia a cada segundo dia. No dia 35 do experimento, os camundongos foram sacrificados por disrupção da espinha dorsal.

**[00518]** Os resultados experimentais são mostrados nas Fig. 17 e Fig. 18 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle.

**[00519]** Os resultados experimentais apresentados nas Fig. 17 e 18 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex.11<sup>a</sup> causou inibição de crescimento de tumor MES-SA/Dx5, com o TGI igual a 81% relativo ao controle no dia 35 do experimento. Para a rhTRAIL114 a 281 utilizada como a referência comparativa, um efeito ligeiramente inibitório sobre o crescimento celular foi obtido relativo ao controle, com o TGI ao nível de 29%. Então, a proteína de fusão da invenção exerceu o efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha.

**[00520]** A proteína de fusão testada não causou efeitos colaterais significativos manifestados por uma diminuição no peso corporal de camundongos (*i.e.* menos do que 10% do peso corporal de linha de base). Isso mostra a baixa toxicidade sistêmica da proteína da invenção.

Modelo de câncer de fígado

Experimento A em células HepG2

**[00521]** No dia 0, camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) na região do flanco direito com  $7 \times 10^6$  de células HepG2 suspensas em 0,1 ml da mistura de 3:1 de tampão de HBSS:Matrigel utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Quando os tumores atingiram o tamanho de 64 a 529 mm<sup>3</sup> (dia 25), os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de ~ 230 mm<sup>3</sup> e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> (80 mg/kg) e rhTRAIL114 a 281 (50 mg/kg) como uma comparação e composto de referência 5-FU (5-Fluoruracil, Sigma-Aldrich) (20 mg/kg). As preparações foram administradas intravenosamente (i.v.) seis vezes a cada segundo dia, 5-FU foi aplicada intraperitonealmente (i.p.). O grupo de controle recebeu o tampão de formulação.

**[00522]** Quando o grupo terapêutico atingiu o tamanho médio de tumor de ~ 1000 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical.

**[00523]** Os resultados experimentais obtidos são mostrados na Fig. 23 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e na Figura 24 que mostra a inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle.

**[00524]** Os resultados do experimento apresentados nas Figuras 23 e 24 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> causou a inibição do crescimento do tumor HepG2, com 94,6% de TGI relativo ao controle no dia 42 do experimento. Para a rhTRAIL114 a 281 como a referência comparativa, um efeito ligeiramente inibitório sobre o crescimento celular foi obtido relativo ao controle, com TGI ao nível de 23,2%. O composto de referência, 5-FU, não mostrou qualquer eficácia contra os

tumores HepG2. Então, a proteína de fusão da invenção exerceu efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha e quimioterapia padrão.

#### Experimento B em células PLC/PRF/5

**[00525]** No dia 0, camundongos Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> foram enxertados subcutaneamente (s.c.) na região do flanco direito com  $7 \times 10^6$  de células PLC/PRF/5 suspensas em 0,1 ml da 3:1 de mistura de tampão de HBSS:Matrigel utilizando seringa com uma agulha de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Quando os tumores atingiram o tamanho de 72 a 536 mm<sup>3</sup> (dia 29), os camundongos foram randomizados a fim de obter o tamanho médio de tumores no grupo de ~ 205 mm<sup>3</sup> e transferidos para grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram administrados com as preparações de proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> (50 mg/kg) e rhTRAIL114 a 281 (50 mg/kg) como uma comparação e composto de referência 5-FU (5-Fluoruracil, Sigma-Aldrich) (30 mg/kg). As preparações foram administradas intravenosamente (i.v.) seis vezes a cada segundo dia, exceto 5-FU, que foi aplicada intraperitonealmente (i.p.) na programação (q1dx5)x2. O grupo de controle recebeu tampão de formulação.

**[00526]** Quando um grupo experimental atingiu o tamanho médio de tumor de ~ 1000 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical.

**[00527]** Os resultados experimentais obtidos são mostrados na Fig. 25 como um diagrama de mudanças do volume do tumor e na Figura 26 que mostra a inibição do crescimento do tumor (% de TGI) como uma percentagem de controle.

**[00528]** Os resultados do experimento apresentado nas Figuras 25 e 26 mostram que a administração da proteína de fusão da invenção de Ex. 16<sup>b</sup> causou a inibição do crescimento do tumor PLC/PRF/5, com 53% de TGI relativo ao

controle no dia 43 do experimento. Para a rhTRAIL114 a 281 e 5-FU como referências comparativas, um efeito ligeiramente inibitório sobre o crescimento celular foi obtido relativo ao controle, com TGI aos níveis de 25,2% e 32,2%, respectivamente. Então, a proteína de fusão da invenção exerceu efeito muito mais forte comparado com a TRAIL sozinha e com a quimioterapia padrão.

### **REIVINDICAÇÕES**

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

- domínio (a) que é um fragmento funcional da sequência de proteína hTRAIL solúvel, cujo fragmento inicia com um aminoácido em uma posição não inferior a hTRAIL 95 e termina com o amino ácido na posição hTRAIL 281, ou um homólogo do dito fragmento funcional que tem pelo menos 70% da identidade de sequência, preferencialmente 85% de identidade, e

- pelo menos um domínio (b) que é a sequência de um peptídeo efector citolítico de formação de poros na membrana celular,

em que a sequência do domínio (b) é fixada ao terminal C e/ou ao terminal N do domínio (a).

2. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o domínio (a) compreende um fragmento de sequência de proteína de hTRAIL solúvel (SEQ. N° 90), que inicia com um amino ácido na faixa de hTRAIL 95 até hTRAIL 121, inclusive, e termina com o aminoácido hTRAIL281.

3. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o domínio (a) é selecionado a partir do grupo que consiste de hTRAIL95 a 281, hTRAIL114 a 281, hTRAIL115 a 281, hTRAIL116 a 281, hTRAIL119 a 281 e hTRAIL121 a 281.

4. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, **caracterizada** pelo fato de que o domínio (b) é selecionado a partir do grupo que consiste de:

- forma ativa de granulicina humana de SEQ. N° 34,

- peptídeo lítico sintético de 15 aminoácidos de



SEQ. N° 35,

- pilosulina-1 de SEQ. N° 36,
- pilosulina-5 de SEQ. N° 37,
- peptídeo a partir de taquiplesina de SEQ. N°

38,

- bombesina-magainina de peptídeo de fusão 2 de  
SEQ. N° 39,

- magainina-2 de SEQ. N° 40,
- peptídeo lítico sintético de 14 aminoácidos de  
SEQ. N° 41,

- cecropina-melitina de peptídeo híbrido de 26  
amino ácidos de SEQ. N° 42,

- FFhCAP18 de peptídeo de 27 amino ácidos de SEQ.  
N° 43,

- peptídeo de BAMP-28 de SEQ. N° 44,
- análogo de isoforma C de peptídeo lítico a  
partir de *Entamoeba histolytica* de SEQ. N° 45,

- análogo de isoforma A de peptídeo lítico a  
partir de *Entamoeba histolytica* de SEQ. N° 46,

- análogo de isoforma B de peptídeo lítico a  
partir de *Entamoeba histolytica* de SEQ. N° 47,

- fragmento de domínio de HA2 de hemaglutinina de  
vírus de influenza de SEQ. N° 48,

- domínio de terminal N de alfa-toxina a partir  
de *Clostridium perfringens* com atividade de fosfolipase C  
de SEQ. N° 49,

- listeriolisina O de SEQ. N° 50,
- fosfolipase PC-PLC de SEQ. N° 51
- equinatoxina EqTx-II de SEQ. N° 52
- viscotoxina A3 (VtA3) de SEQ. N° 53

- fragmento ativo de perforina humana de SEQ. N° 54,

- parasporina-2 z de *Bacillus thuringensis* de SEQ. N° 55, i

- peptídeo de fusão compreendendo um inibidor de EGF e peptídeo lítico sintético de SEQ. N° 56,

- proteína de fusão compreendendo peptídeo lítico sintético com motivo de KLLK e um peptídeo sendo antagonista do receptor de PDGF de SEQ. N° 125,

- análogo de pleurocidina de SEQ. N° 126,

- análogo de pleurocidina de SEQ. N° 127,

- peptídeo lítico sintético de SEQ. N° 128,

- peptídeo de fusão compreendendo bombesina e peptídeo de B27 de SEQ. N° 129,

- petídeo B27 sintético de 17 aminoácidos de SEQ. N° 130,

- peptídeo de fusão compreendendo bombesina e peptídeo B28 de SEQ. N° 131, e

- peptídeo de melitina de SEQ. N° 132.

5. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, **caracterizada** pelo fato de que o domínio (b) é um peptídeo com uma forte carga positiva selecionado a partir do grupo que consiste de:

- forma ativa de granulicina humana de SEQ. No. 34,

- peptídeo lítico sintético de 15 amino ácidos de SEQ. No. 35,

- peptídeo a partir de taquiplesina de SEQ. No. 38,

- bombesina-magainina de peptídeo de fusão 2 de SEQ. No. 39,
- magainina-2 de SEQ. No. 40,
- cecropina-melitina de peptídeo híbrido de 26 amino ácidos de SEQ. No. 42,
- viscotoxina A3 (VtA3) de SEQ. No. 53,
- peptídeo de fusão compreendendo um inibidor de EGF e peptídeo lítico sintético de SEQ. No. 56,
- um peptídeo de fusão compreendendo bombesina e peptídeo B27 de SEQ. No. 129,
- peptídeo B27 sintético de 17 amino ácidos de SEQ. No. 130,
- um peptídeo de fusão compreendendo bombesina e peptídeo B28 de SEQ. No. 131, e
- peptídeo de melitina de SEQ. No. 132.

6. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, **caracterizada** pelo fato de que o domínio (b) é um peptídeo com alfa-hélice anfipático selecionado a partir do grupo que consiste de:

- pilosulina-1 de SEQ. No. 36,
- pilosulina-5 de SEQ. No. 37,
- peptídeo lítico sintético de 14 amino ácidos de SEQ. No. 41,
- FFhCAP18 de peptídeo de 27 amino ácidos de SEQ. No. 43,
- peptídeo de BAMP-28 de SEQ. No. 44,
- análogo de isoforma C de peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica* de SEQ. No. 45,

- análogo de isoforma A de peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica* SEQ. No. 46,
- análogo de isoforma B de peptídeo lítico a partir de *Entamoeba histolytica* de SEQ. No. 47,
- fragmento de domínio de HA2 de hemaglutinina de vírus de influenza de SEQ. No. 48,
- fragmento ativo de perforina humana de SEQ. No. 54,
- parasporina-2 z *Bacillus thuringensis* de SEQ. No. 55,
- proteína de fusão compreendendo peptídeo lítico sintético com motivo de KLLK e um peptídeo sendo antagonista de receptor de PDGF de SEQ. No. 125,
- análogo de pleurocidina de SEQ. No. 126,
- análogo de pleurocidina de SEQ. No. 127, e
- peptídeo lítico sintético de SEQ. No. 128.

7. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, **caracterizada** pelo fato de que o domínio (b) é um peptídeo com atividade enzimática selecionado a partir do grupo de fosfolipase, hemolisina e/ou citolisina, preferencialmente selecionado a partir do grupo que consiste de:

- domínio de terminal N de alfa-toxina a partir de *Clostridium perfringens* com atividade de fosfolipase C de SEQ. No. 49,
- listeriolisina O de SEQ. No. 50,
- fosfolipase PC-PLC de SEQ. No. 51, e
- equinatoxina EqTx-II de SEQ. No. 52.

8. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, **caracterizada** pelo fato de que entre o domínio (a) e o domínio (b) ou entre domínios (b) contém domínio (c) contendo local de clivagem de protease, selecionado a partir de uma sequência reconhecida pelo MMP de metaloprotease, uma sequência reconhecida por uPA de uroquinase, e uma sequência reconhecida por furina e uma sequência reconhecida por furina nativa.

9. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que uma sequência reconhecida pelo MMP de metaloprotease é Pro Leu Gly Leu Ala Gly, uma sequência reconhecida por uPA de uroquinase é Arg Val Val Arg, uma sequência reconhecida por furina é Arg Lys Lys Arg, e uma sequência reconhecida por furina nativa é Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu ou His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln.

10. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, **caracterizada** pelo fato de que o domínio (c) é uma combinação de sequência reconhecida pelo MMP de metaloprotease e uma sequência reconhecida por uPA de uroquinase localizada perto uma da outra.

11. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, **caracterizada** pelo fato de que o peptídeo efector de domínio (b) está conectado adicionalmente com o domínio de transporte (d), selecionado a partir do grupo que consiste de:

- (d1) sequência de polihistidina que transporta através da membrana celular compreendendo 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 resíduos de His, e

(d2) sequência de poliarginina que transporta através de uma membrana celular, consistindo de 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 resíduos de Arg,

(d3) sequência de transporte de PD4 (domínio de transdução de proteína 4) Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala,

(d4) uma sequência de transporte que consiste de sequência de ligação de receptor de transferrin Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro, e

(d5) sequência de transporte de PD5 (domínio de transdução de proteína 5, proteína TAT) Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg, e combinações dessas.

12. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que a sequência (d) está localizada no terminal C ou no terminal N do domínio (b) do peptídeo efetor.

13. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de transporte (d) está localizado entre o domínio (b) e o domínio (c), ou entre o domínio (a) e o domínio (c) ou entre os dois domínios (c).

14. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que a sequência (d) está localizada no terminal C da proteína de fusão.

15. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14, **caracterizada** pelo fato de que entre dois domínios (c) contém o domínio (e) que é um ligante para fixar a molécula PEG, selecionada a partir de

Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly e Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu.

16. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente um ligante estérico flexível entre os domínios (a), (b) e/ou (c).

17. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizada** pelo fato de que o ligante estérico é selecionado a partir de Gly Gly, Gly Gly Gly, Gly Ser Gly, Gly Gly Gly Gly Ser, Gly Gly Gly Gly Gly Ser, Gly Gly Ser Gly Gly, Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly, Gly Gly Gly Gly Ser Gly, Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser, Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly, Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly, Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys, Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys, Ser Gly Gly, resíduo de glicina único Gly, e resíduo de cisteína único Cys, e combinações desses.

18. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que tem a sequência de amino ácido selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ. No. 1; SEQ. No. 2; SEQ. No. 3; SEQ. No. 4; SEQ. No. 5; SEQ. No. 6; SEQ. No. 7; SEQ. No. 8; SEQ. No. 9; SEQ. No. 10; SEQ. No. 11; SEQ. No. 12; SEQ. No. 13; SEQ. No. 14; SEQ. No. 15; SEQ. No. 16; SEQ. No. 17; SEQ. No. 18; SEQ. No. 19; SEQ. No. 20; SEQ. No. 21; SEQ. No. 22; SEQ. No. 23; SEQ. No. 24; SEQ. No. 25; SEQ. No. 26, SEQ. No. 27; SEQ. No. 28; SEQ. No. 29; SEQ. No. 30; SEQ. No. 31; SEQ. No. 32, SEQ. No. 33; SEQ. No. 91; SEQ. No. 92; SEQ. No. 93; SEQ. No. 94; SEQ. No. 95; SEQ. No. 96; SEQ. No. 97, SEQ. No. 98; SEQ. No. 99; SEQ. No. 100; SEQ. No. 101; SEQ. No. 102; SEQ. No. 103, SEQ. No. 104; SEQ. No. 105; SEQ. No. 106, e SEQ. No. 107.

19. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18, **caracterizada** pelo fato de que é uma proteína recombinante.

20. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende como um ingrediente ativo a proteína de fusão conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 19, combinada com um veículo aceito farmaceuticamente.

21. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizada** pelo fato de que está em uma forma para administração parenteral.

22. Uso de uma proteína de fusão conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 19 **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para uso no tratamento de doenças neoplásticas em mamíferos, incluindo humanos.



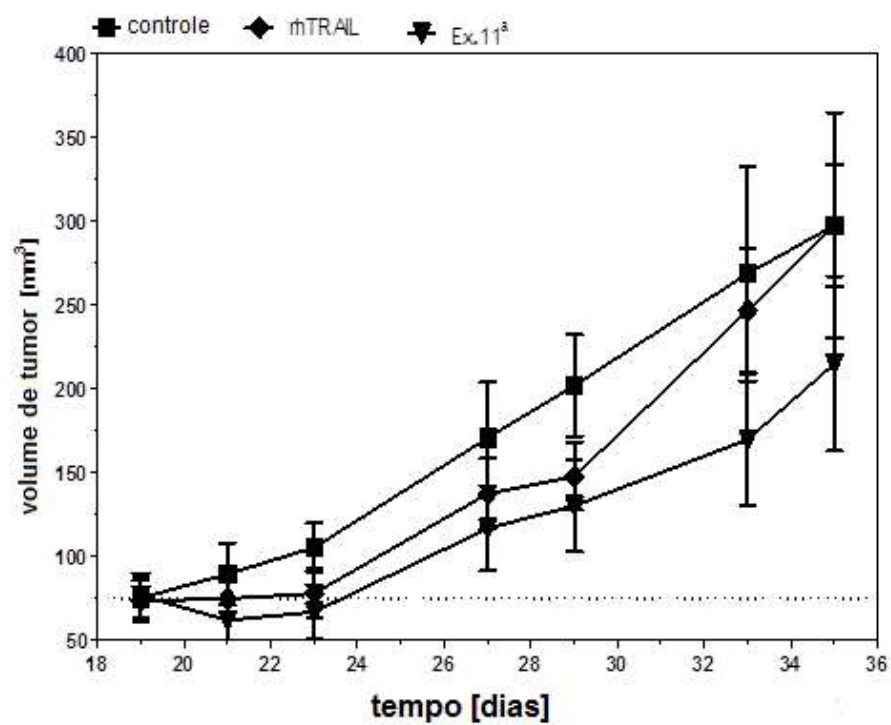


Fig. 1

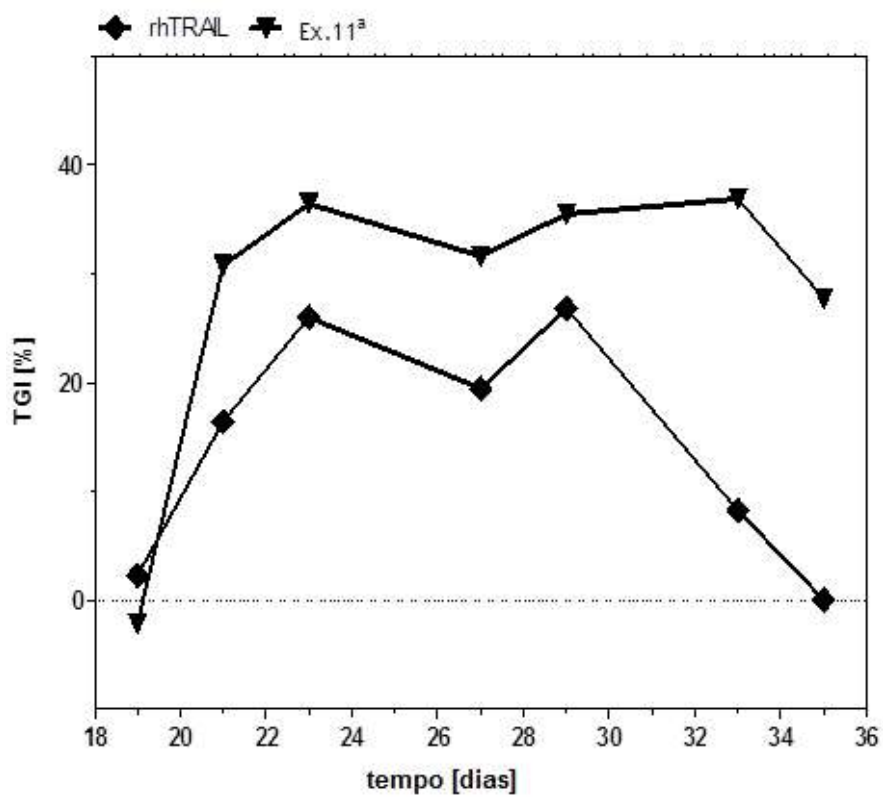


Fig. 2

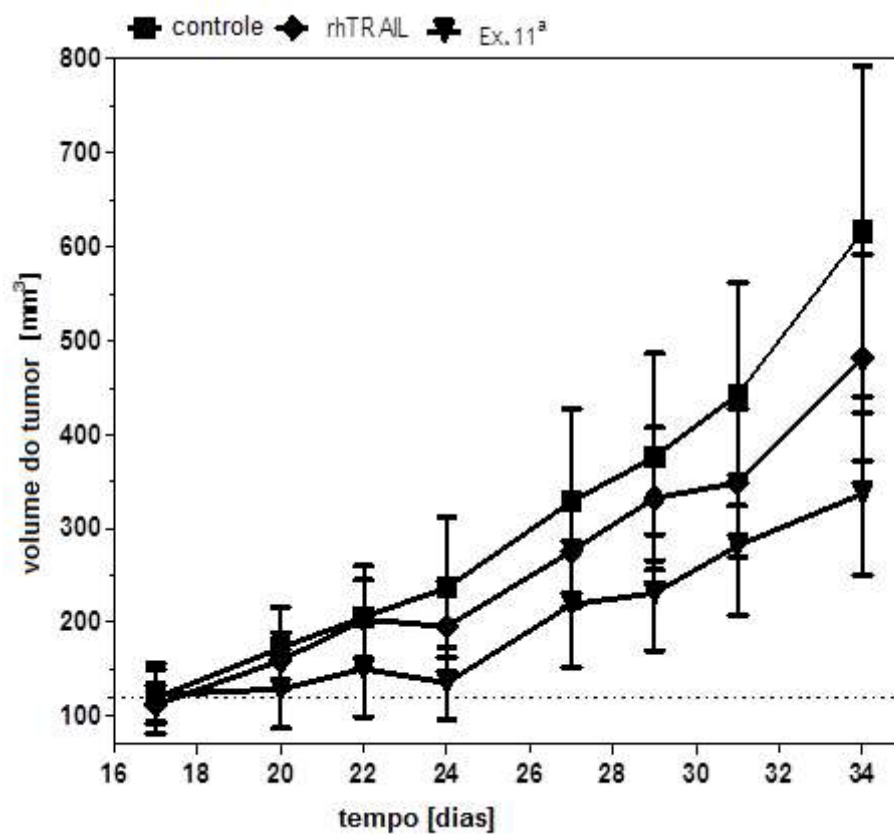


Fig. 3

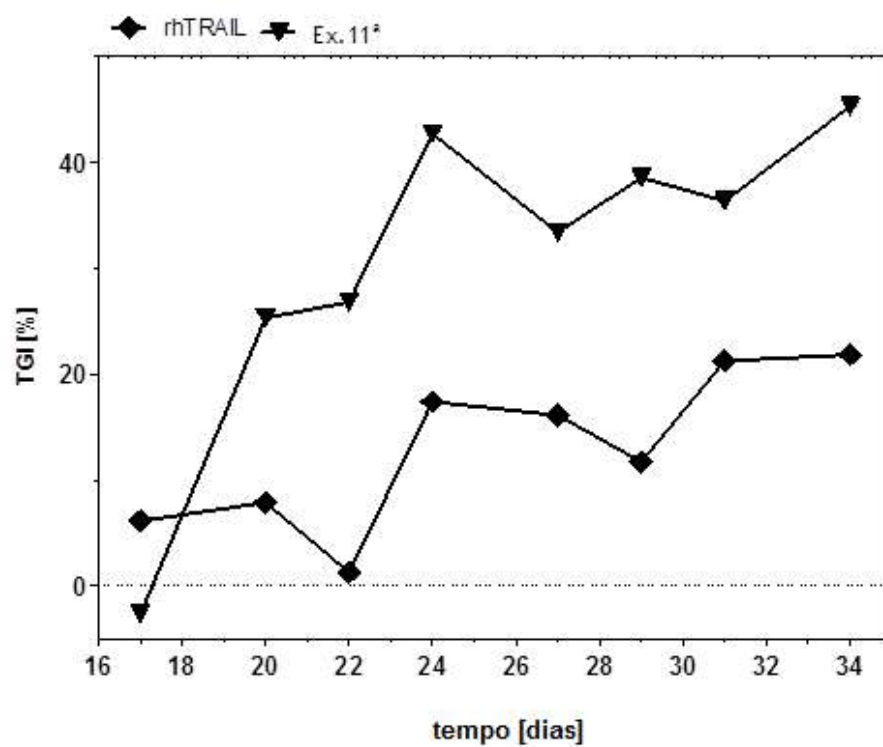


Fig. 4

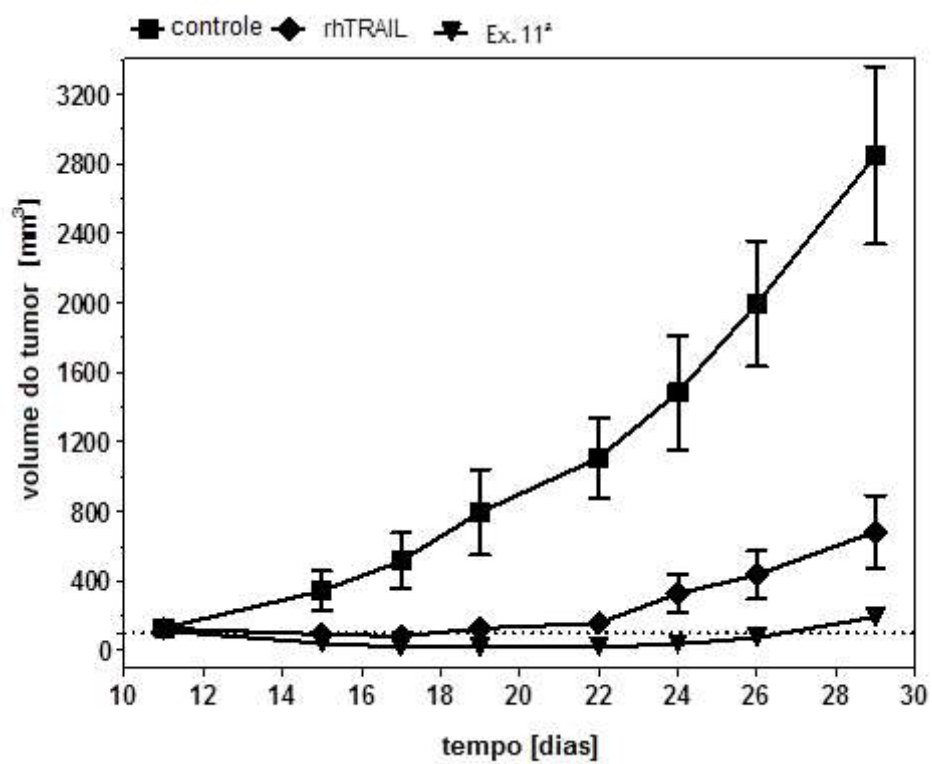


Fig. 5

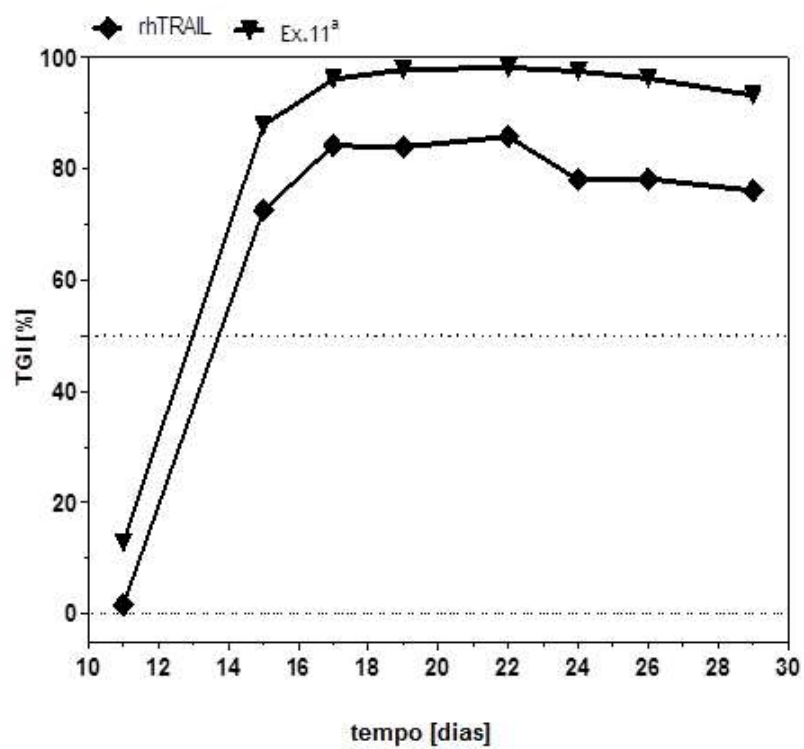


Fig. 6

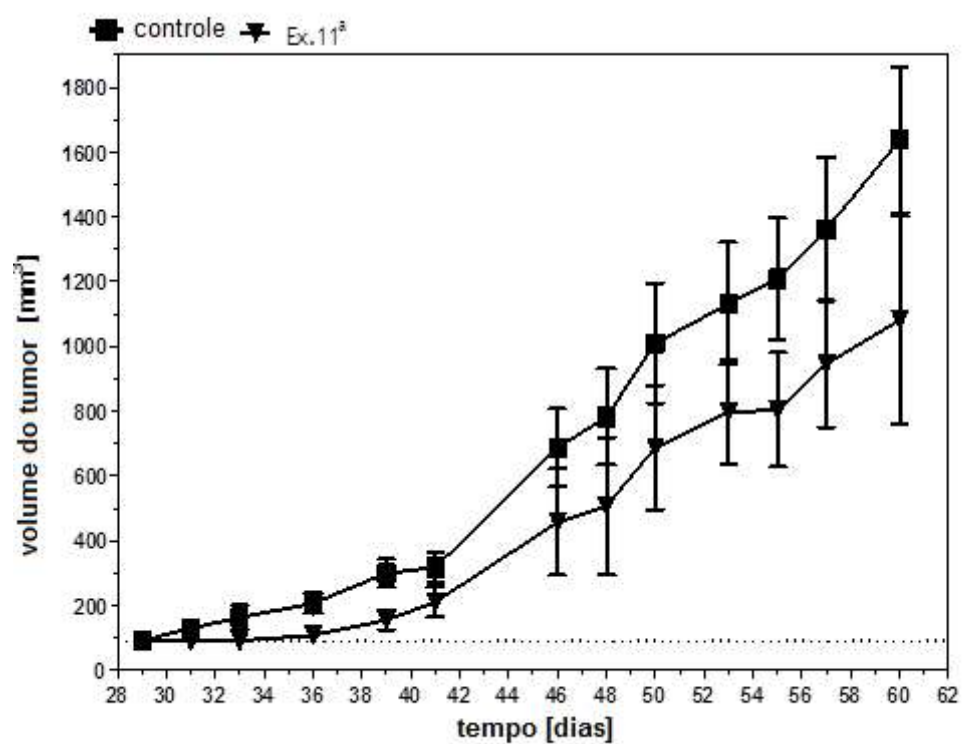


Fig. 7

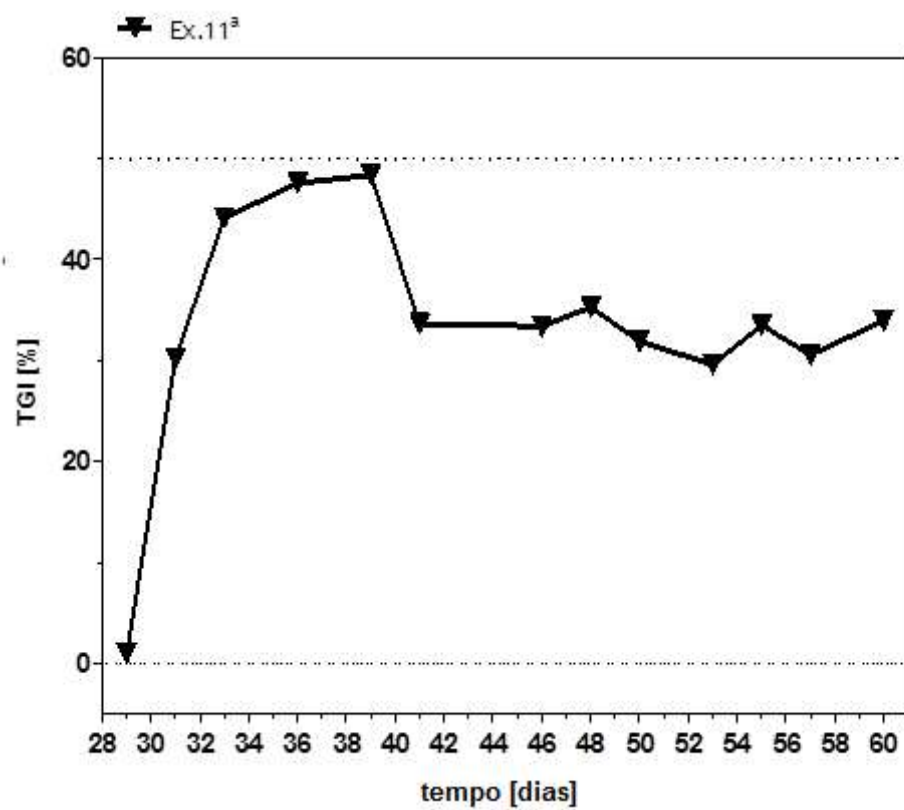


Fig. 8

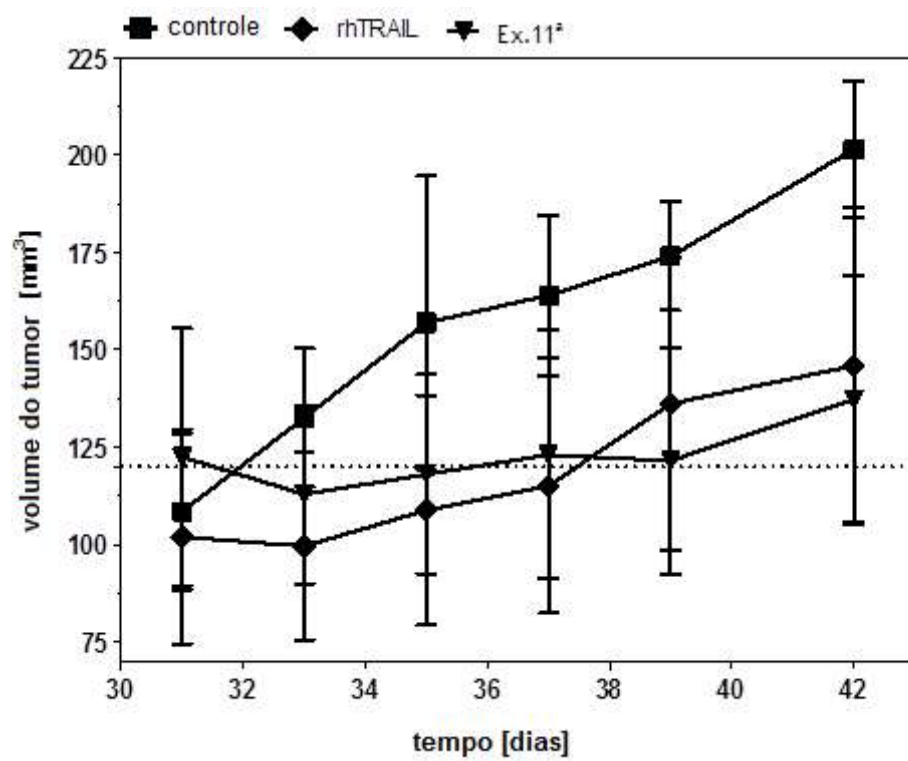


Fig. 9

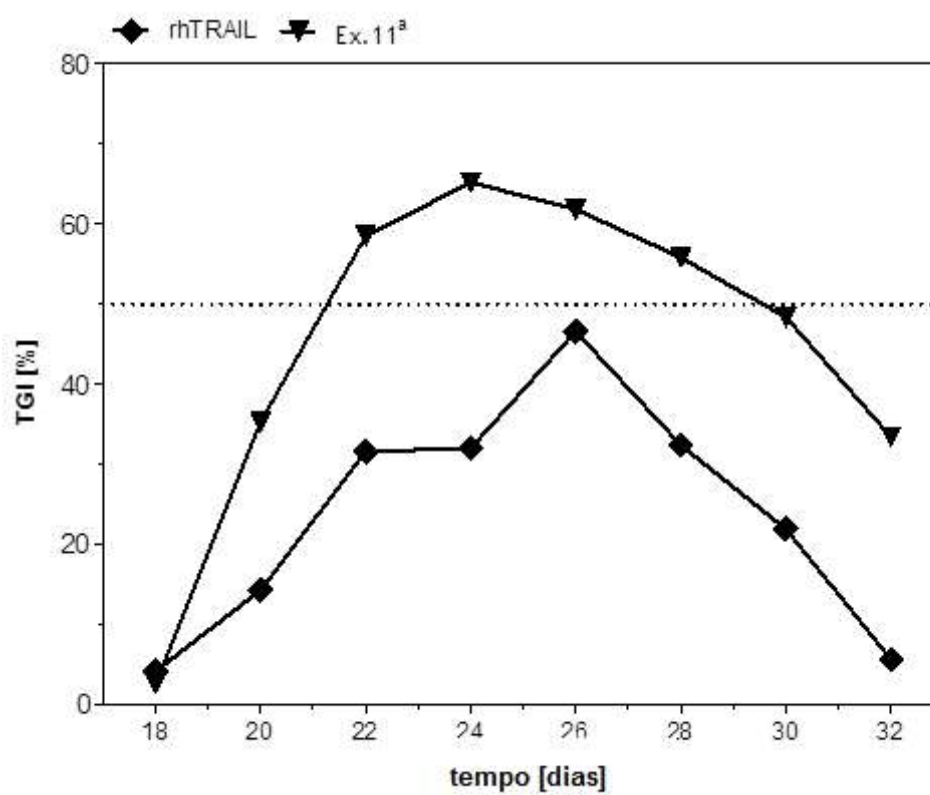


Fig. 10

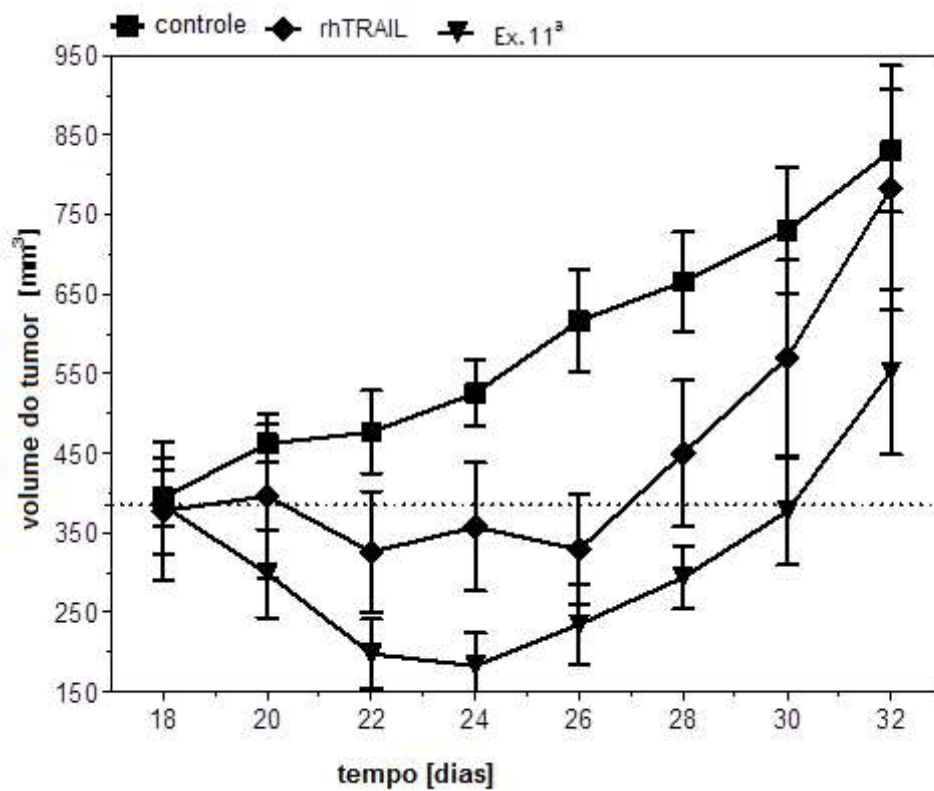


Fig. 11

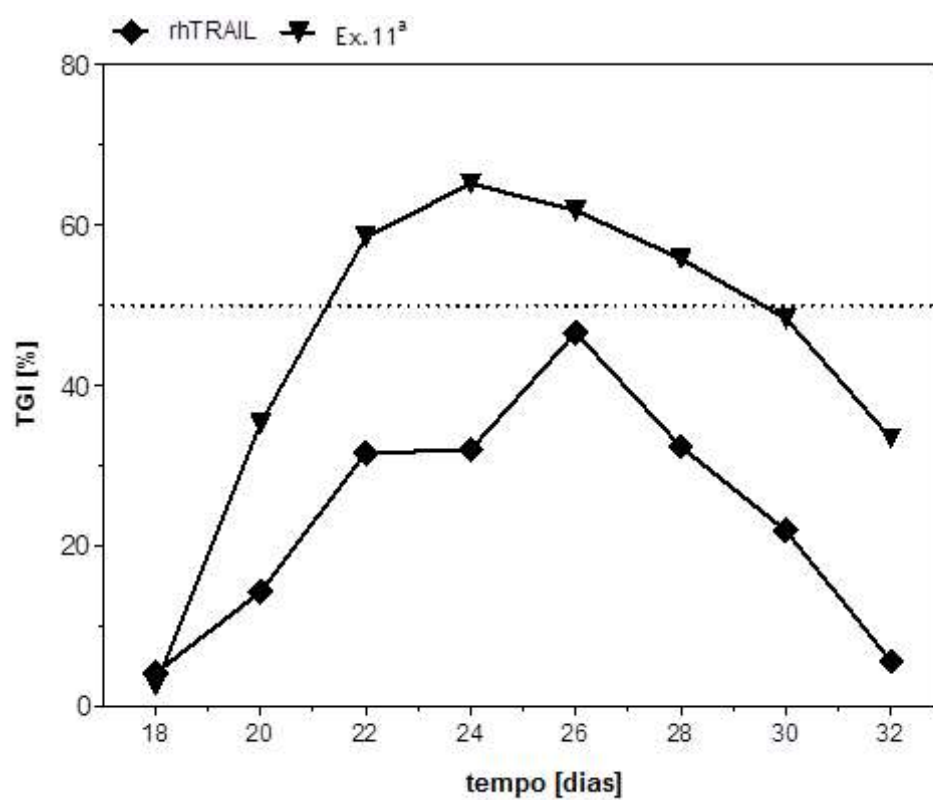


Fig.12

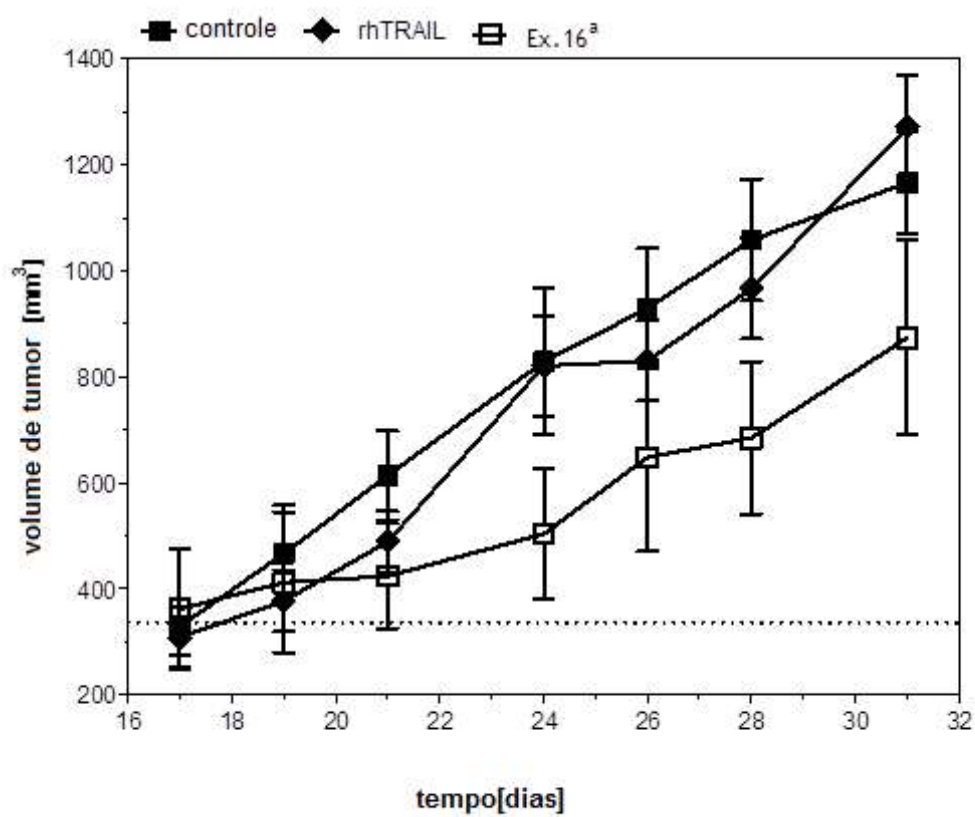


Fig. 13

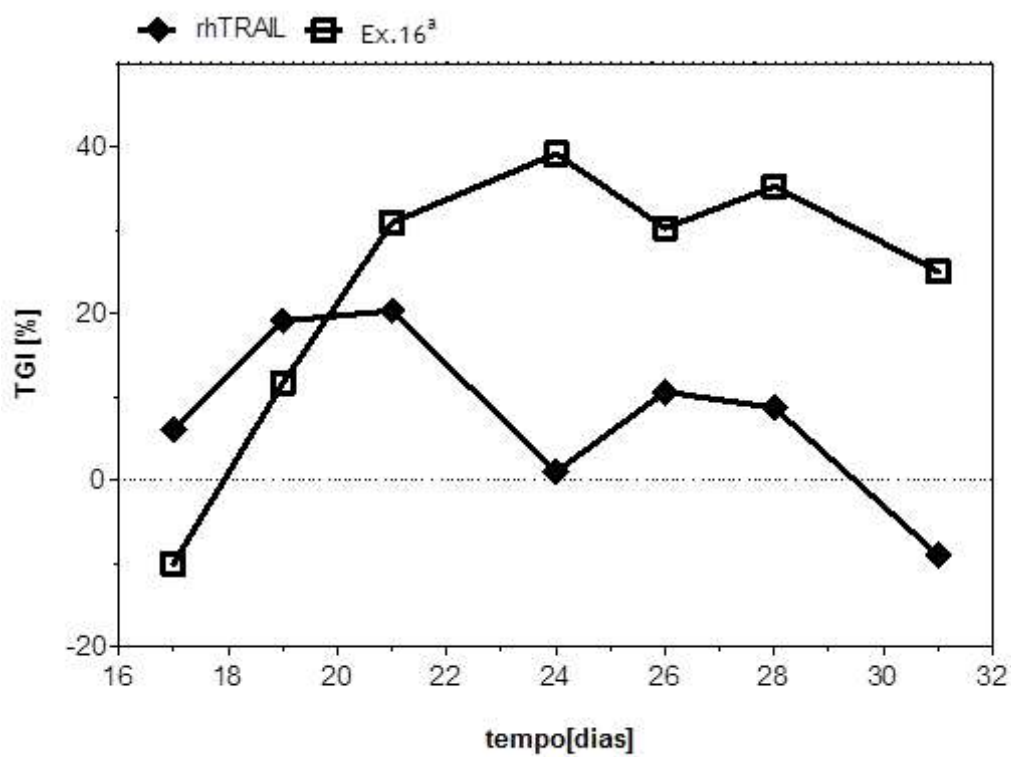


Fig. 14

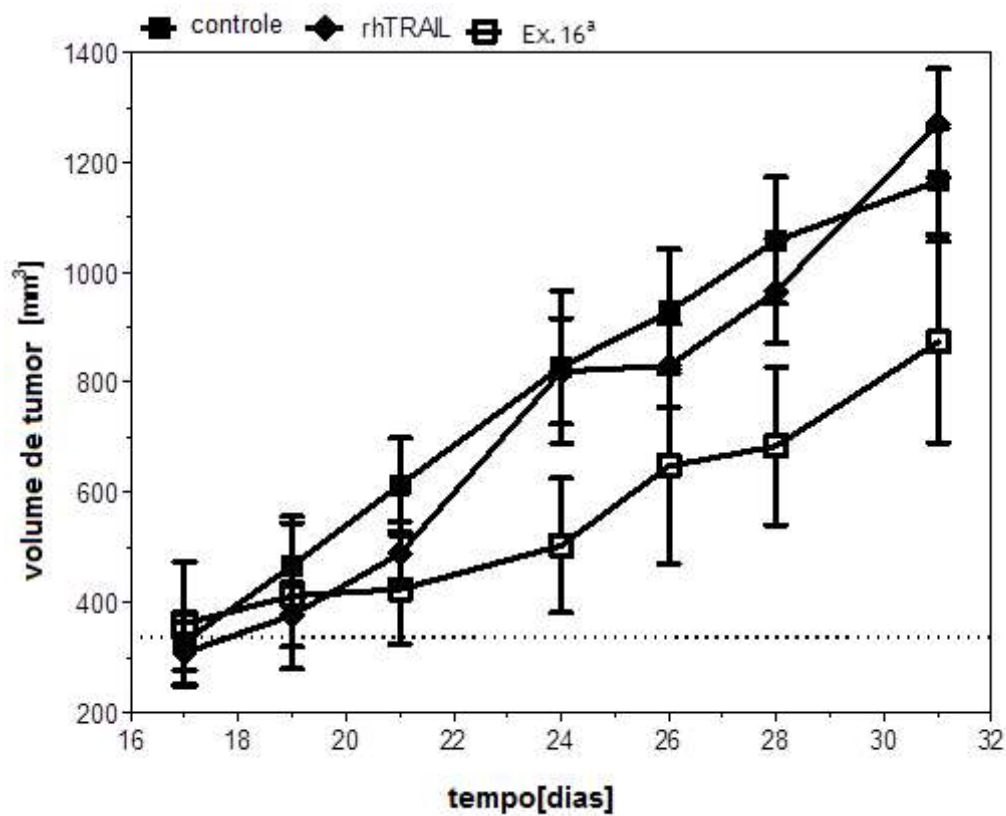


Fig. 15

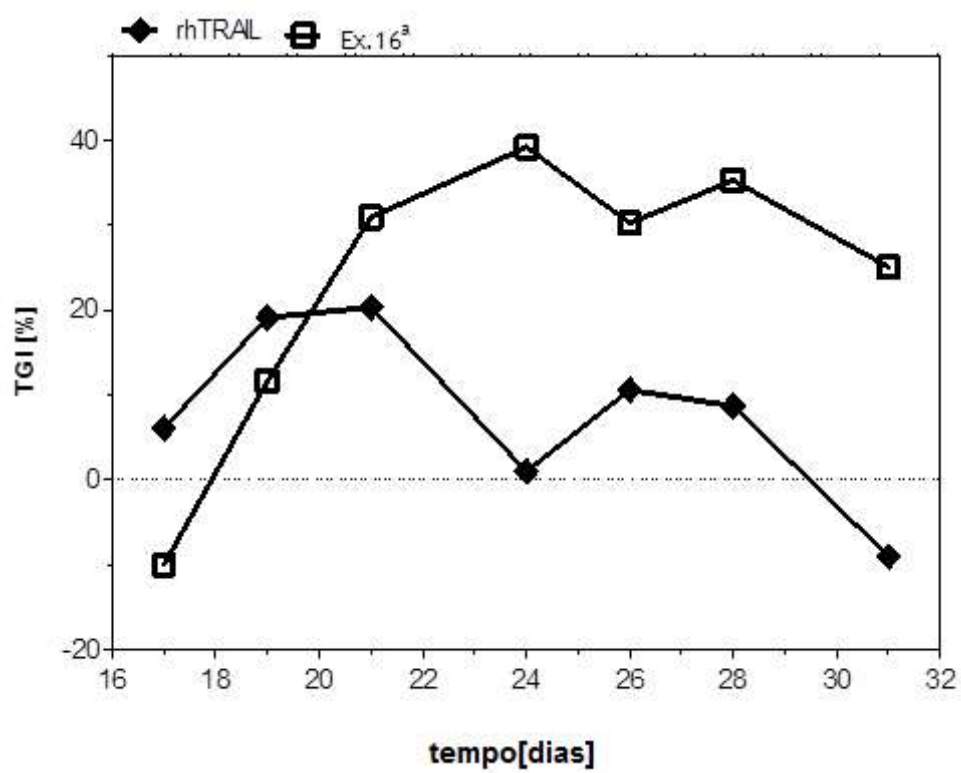


Fig. 16



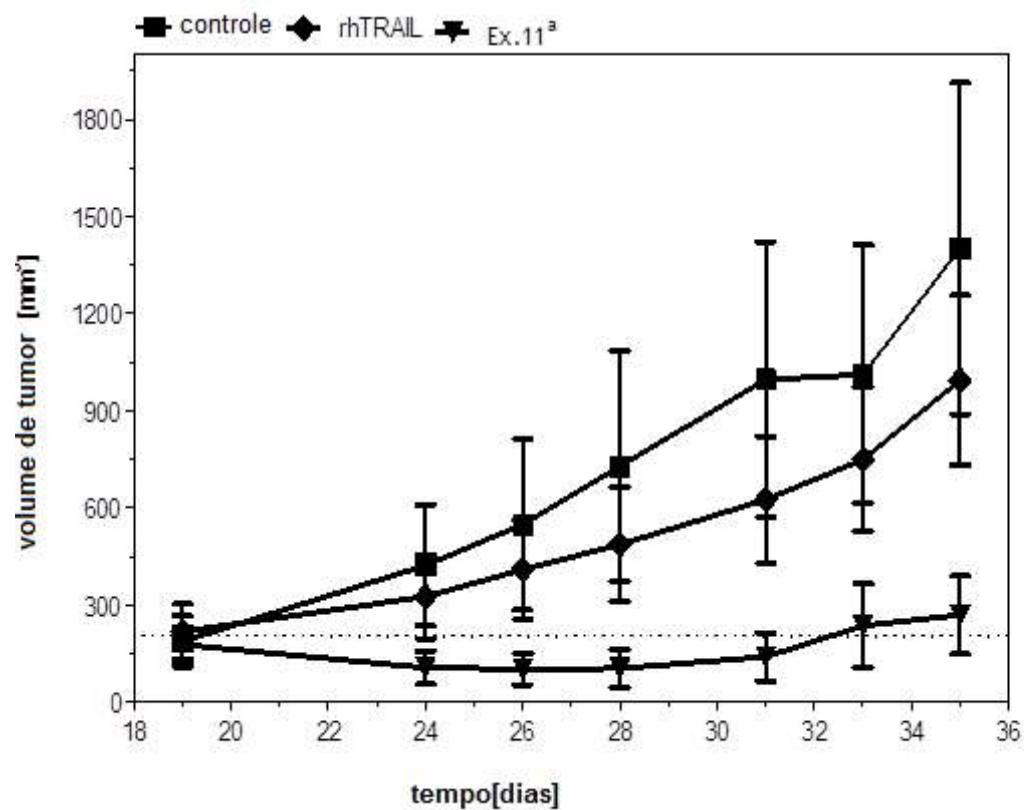


Fig. 17

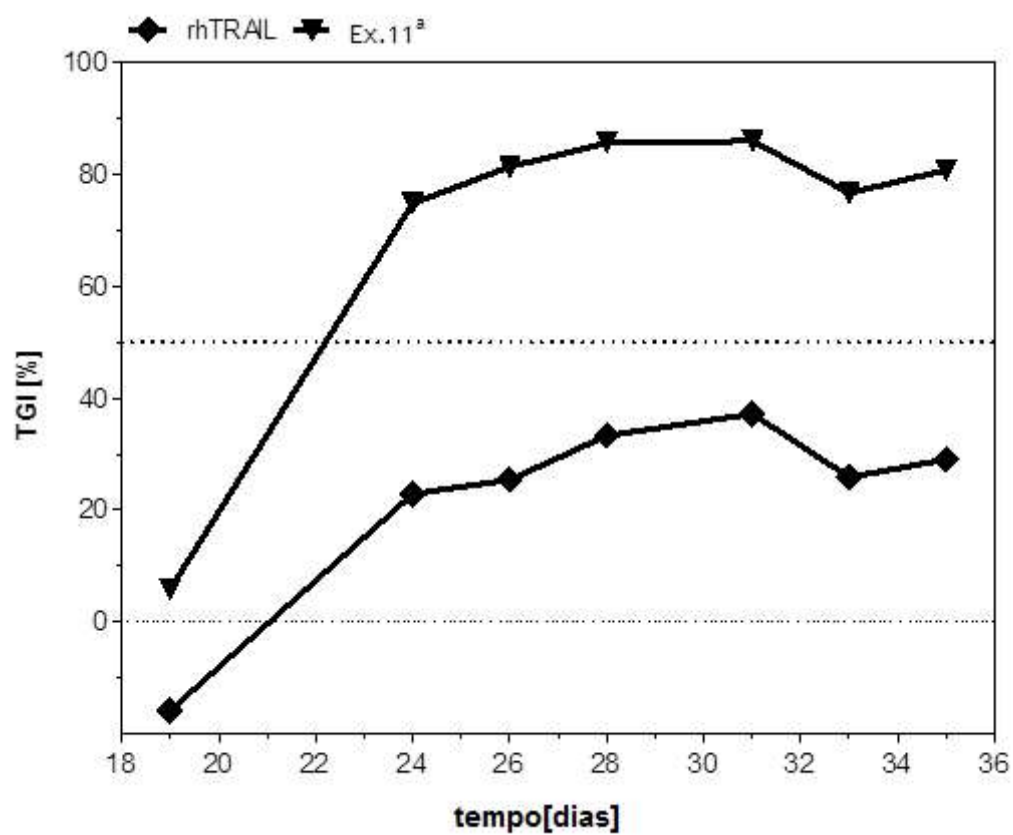


Fig. 18

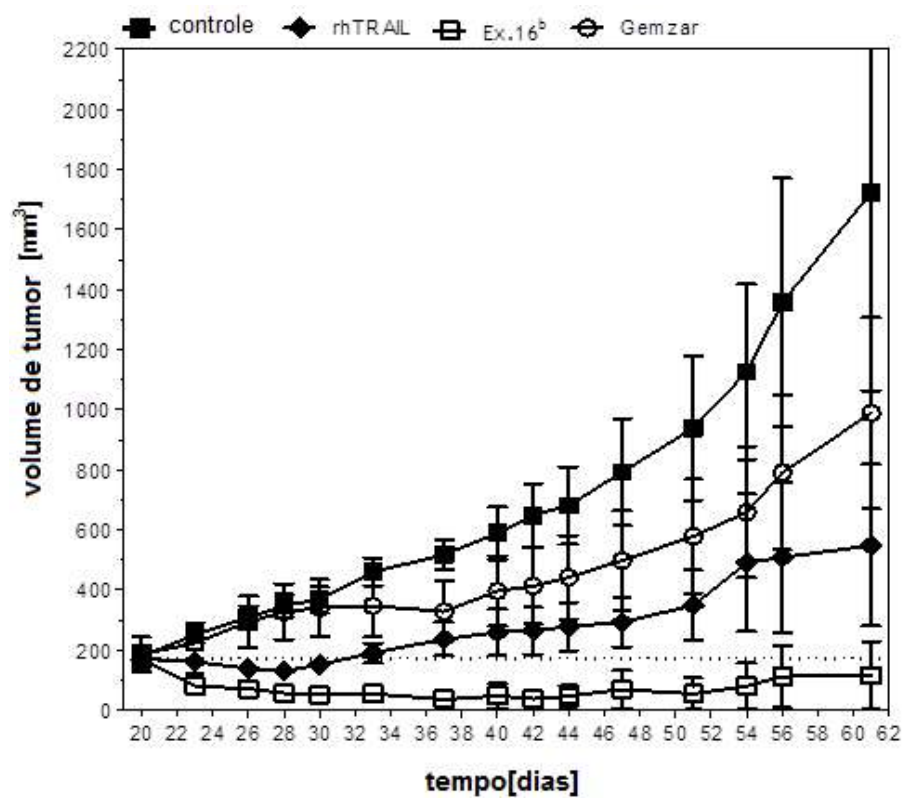


Fig. 19

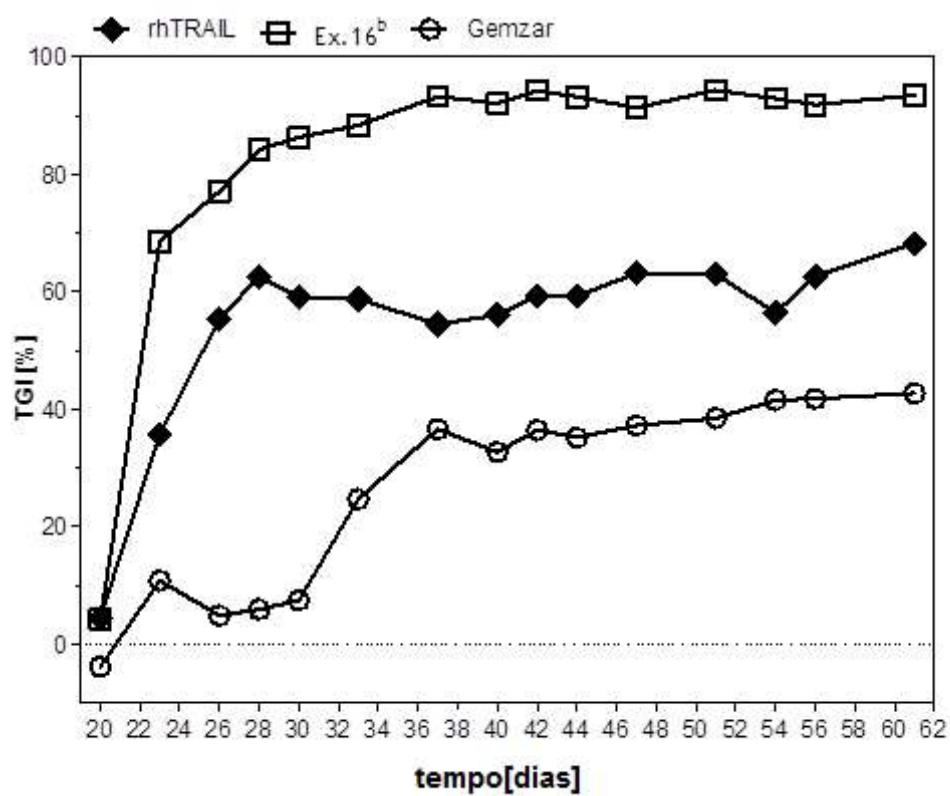


Fig. 20

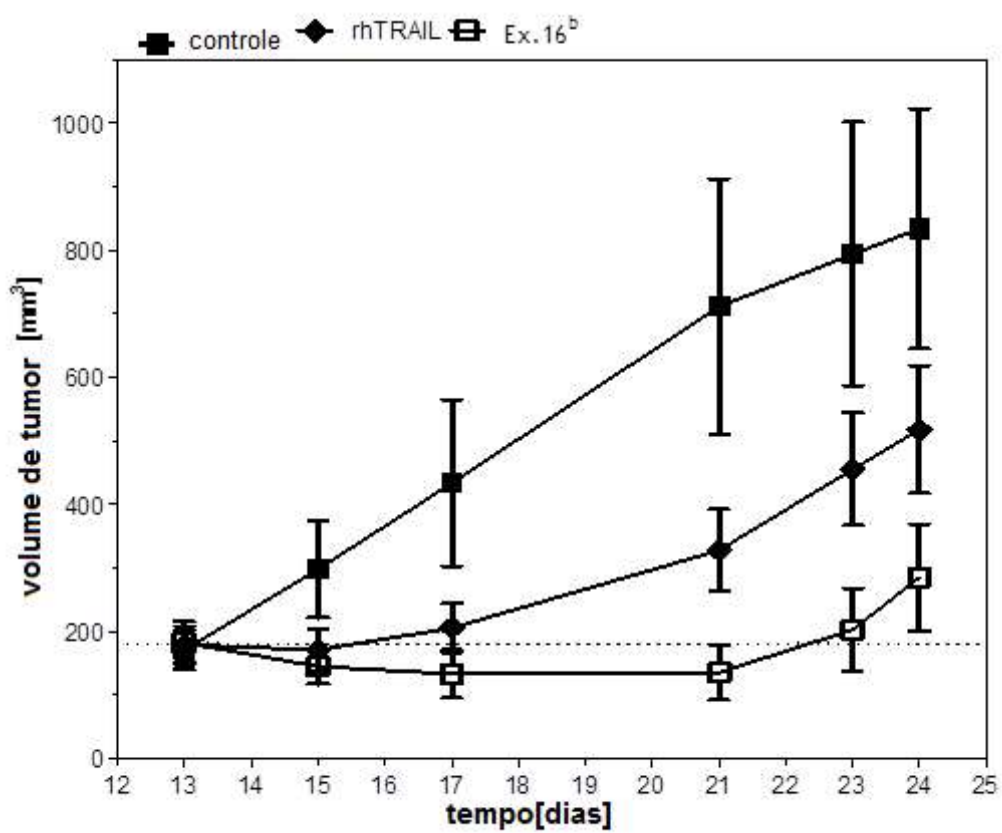


Fig. 21

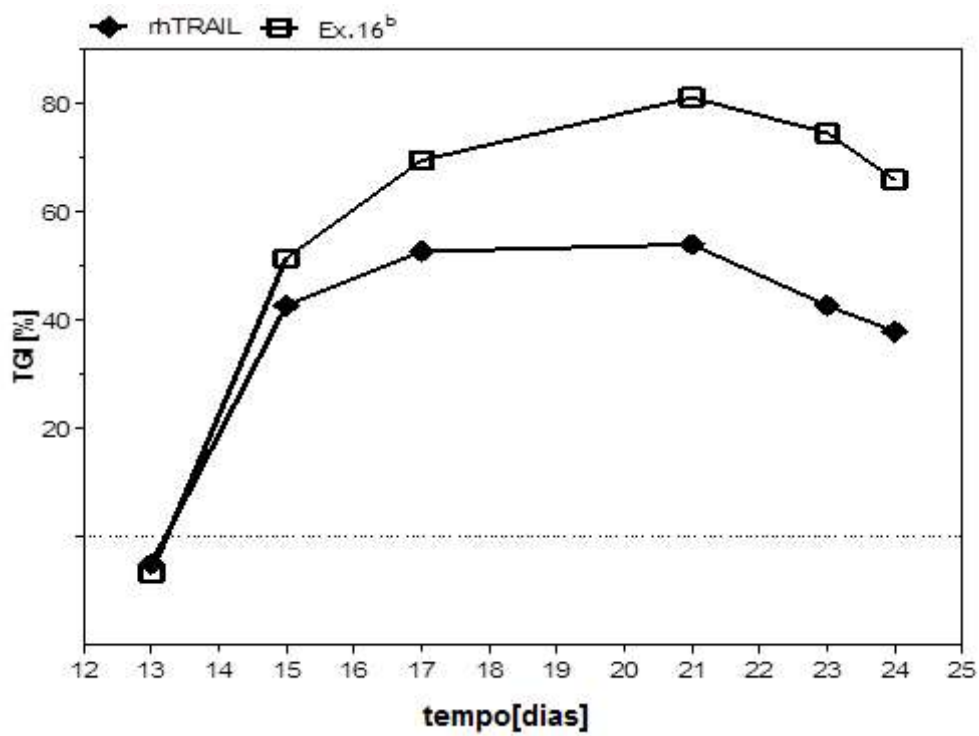


Fig. 22

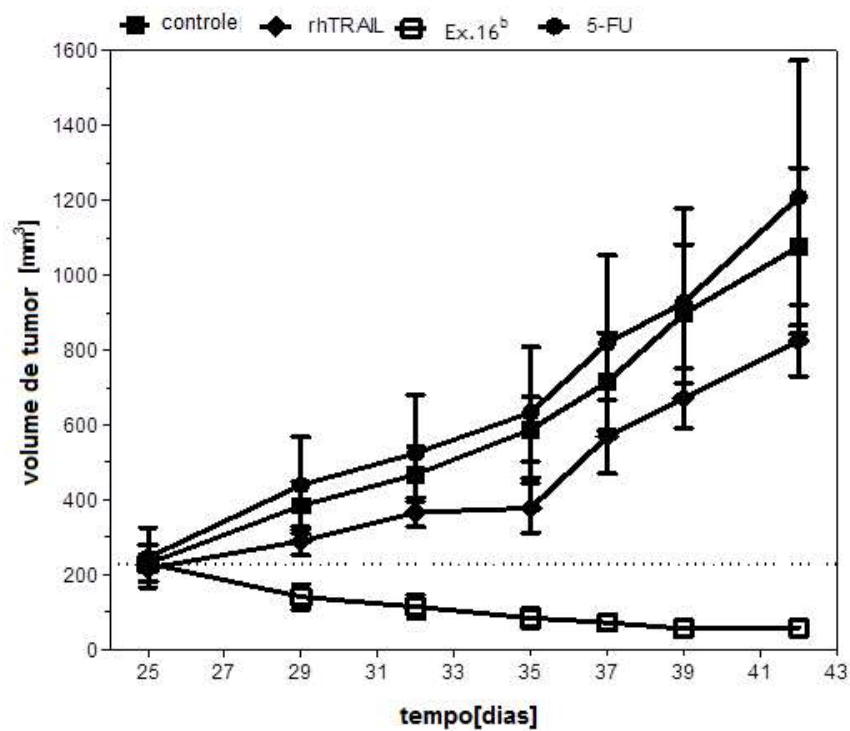


Fig. 23

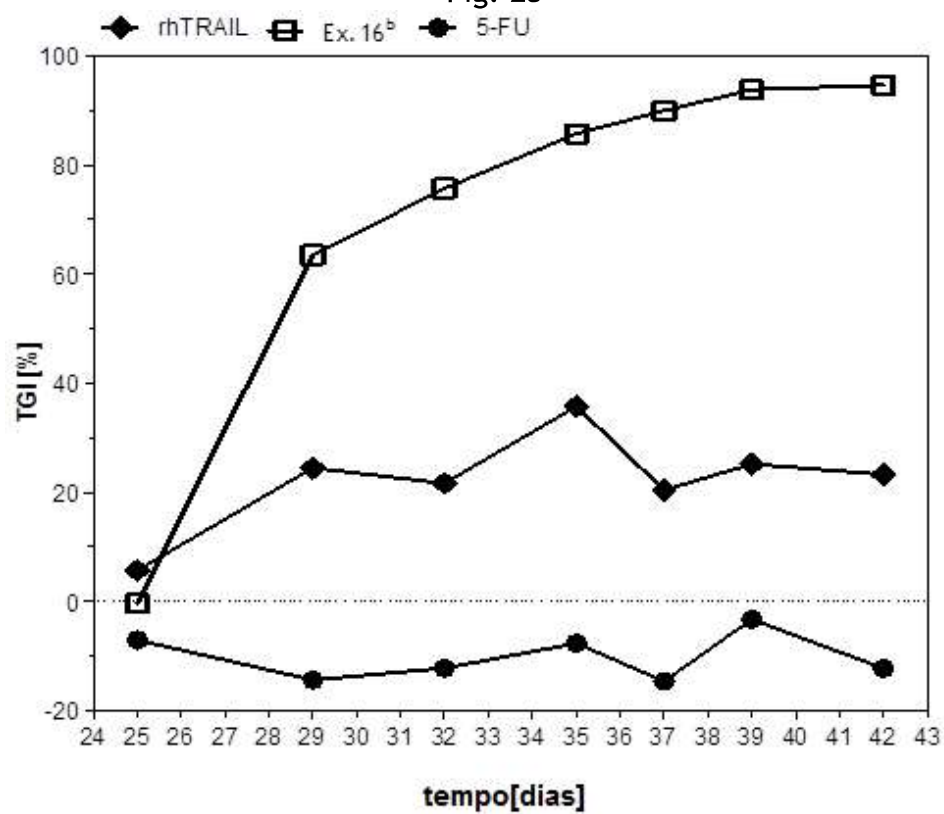


Fig. 24

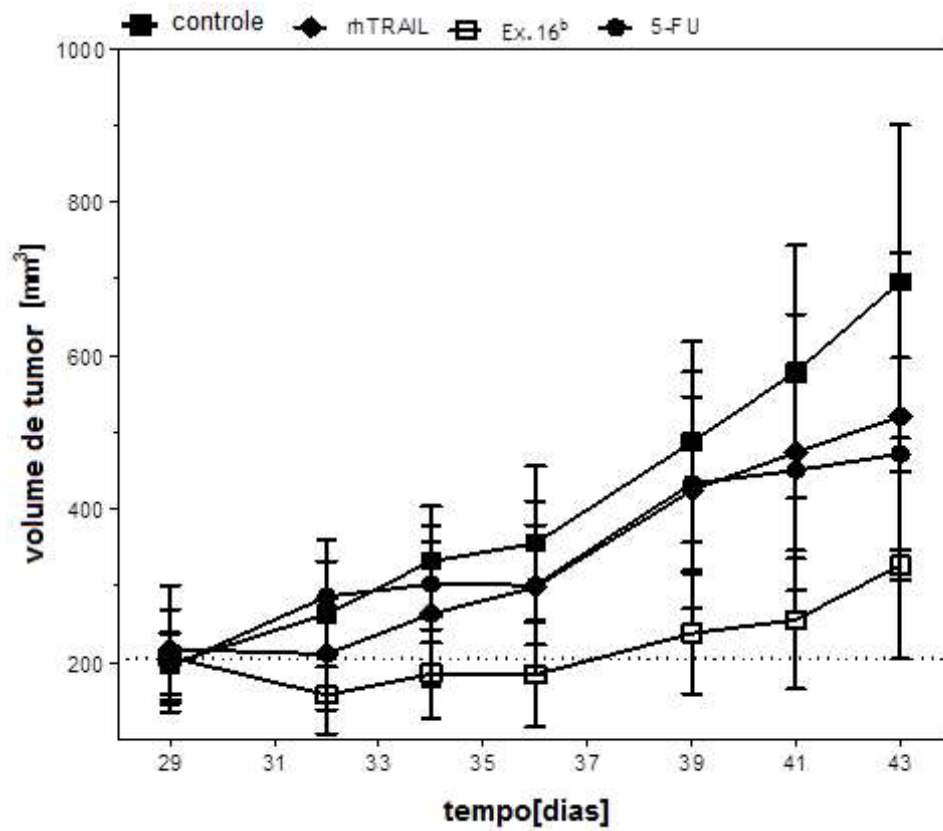


Fig. 25

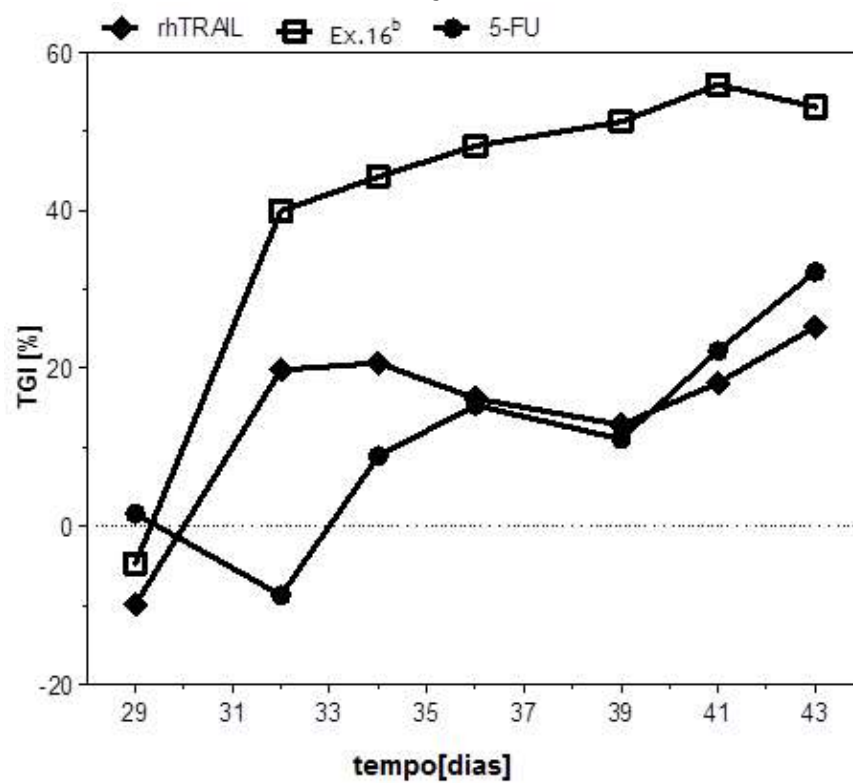


Fig. 26

RESUMO**PROTEÍNA DE FUSÃO ANTICÂNCER**

A presente invenção descreve uma proteína de fusão compreendendo domínio (a) que é um fragmento funcional de sequência de proteína hTRAIL, cujo fragmento começa com um amino ácido em uma posição não inferior a hTRAIL 95, ou um homólogo do dito fragmento funcional que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, preferencialmente 85% de identidade e terminando com o amino ácido hTRAIL281; e pelo menos um domínio (b) que é uma sequência de peptídeo efetor citolítico de formação de poros na membrana celular, em que a sequência de domínio (b) é fixada ao terminal C ou terminal N de domínio (a). A proteína de fusão pode ser utilizada para o tratamento de doenças do câncer.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

### **Código de Controle**

Campo 1



742BCE2634C59E79

Campo 2



B16CDF1055026781

### **Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência.txt
- Data de Geração do Código: 24-06-2014
- Hora de Geração do Código: 11:03:05
- Código de Controle:
  - Campo 1: 742BCE2634C59E79
  - Campo 2: B16CDF1055026781