



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

(21) BR 112020024034-6 A2



(22) Data do Depósito: 06/06/2019

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

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE CÂNCER

(51) Int. Cl.: C07K 14/78; C12N 15/12; C12N 1/20; A61K 38/00; G01N 33/68.

(30) Prioridade Unionista: 08/06/2018 EM PCT/EP2018/065205.

(71) Depositante(es): BIONTECH SE.

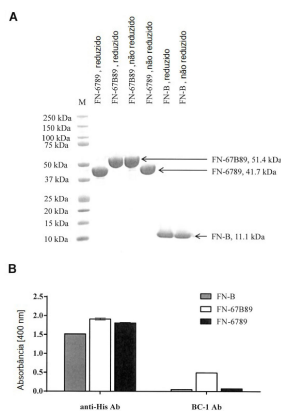
(72) Inventor(es): UGUR SAHIN; BONNY GABY LUI; NADJA SALOMON; JOYCELYN WÜSTEHUBE-LAUSCH; MATIN DANESCHDAR; HANS-ULRICH SCHMOLDT; MARKUS FIEDLER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2019064872 de 06/06/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/234190 de 12/12/2019

(85) Data da Fase Nacional: 25/11/2020

(57) Resumo: A presente invenção se refere ao diagnóstico e tratamento de doenças que expressam o Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina tais como doenças caracterizadas por remodelação do tecido e/ou angiogênese, em particular doenças cancerígenas, tais como câncer de cabeça e pescoço, cérebro, colorretal, pulmão, próstata e de mama. Mais particularmente, a invenção diz respeito a peptídeos que alvejam o Domínio Extra B da Fibronectina.



“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO

E TRATAMENTO DE CÂNCER”

RELATÓRIO DESCRITIVO

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere ao diagnóstico e tratamento de doenças que expressam Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina tais como doenças caracterizadas por remodelação e/ou angiogênese de tecido, em particular, doenças cancerígenas, tais como câncer de cabeça e pescoço, cérebro, colorretal, pulmão, próstata e mama. Mais particularmente, a invenção diz respeito a peptídeos que alvejam o Domínio Extra B da Fibronectina.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Câncer é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, ultrapassando doença cardíaca. 8,2 milhões de pessoas da população global morreram de câncer em 2012 (WHO). Terapias anticâncer clássicas, por exemplo, radioterapia, quimioterapia e procedimentos cirúrgicos convencionais, frequentemente estão sujeitas a baixa seletividade e, dessa forma, a graves efeitos colaterais tóxicos no tecido sadio. Formas inéditas de tratamento consistem na distribuição direcionada de moléculas bioativas (fármacos, citocinas, radionuclídeos, etc.) no ambiente tumoral por meio de moléculas de ligação específicas para antígenos associados a tumor. Isso permitirá a direção seletiva de fármacos para tecido de tumor positivo alvo e efetivamente exterminará células malignas sem prejudicar células saudáveis. Isso se dá junto com o desenvolvimento do assim denominado diagnóstico de companhia que permite a determinação de tumores alvo-positivos em um paciente a fim de garantir antecipadamente uma estratégia razoavelmente adaptada para terapia de câncer de indivíduo. Nisso, a aplicação de técnicas de formação de imagem específicas do alvo tornou-se uma importante

etapa de diagnóstico revelando um avanço impressionante durante as últimas décadas. As técnicas de formação de imagem podem fornecer informação crítica a respeito da presença e quantidade de proteínas associadas a tumor, localização, detecção precoce, distribuição, estratificação do paciente, e monitoramento do tratamento. Formação de imagem de tumor representa um processo fundamental para o diagnóstico de câncer e o monitoramento do sucesso terapêutico em tratamento de câncer. Técnicas de longa data, tal como varredura por tomografia computadorizada ou imagem por ressonância magnética, têm sido rotineiramente usadas há décadas. Entretanto, a formação de imagem molecular direcionada ganha mais atenção já que visualiza precisamente tumores usando agentes moleculares direcionados contra proteínas associadas a câncer. Biomarcadores que emergem durante angiogênese de tumor são por meio disso muito úteis, em virtude de serem normalmente expressos em altos níveis nos vasos sanguíneos e conseqüentemente serem facilmente acessíveis a partir da corrente sanguínea.

[003] Fibronectina (FN) é uma glicoproteína ligada a dissulfeto dimérico da matriz extracelular, consistindo em domínios tipo I, tipo II e tipo III. A proteína contribui para muitos processos fisiológicos, incluindo adesão, migração, diferenciação e homeostase celular. FN é expressa como múltiplas variantes alternativamente submetidas a *splicing* derivadas de um transcrito primário. A isoforma Domínio Extra B (EDB) compreende um domínio tipo III adicional de 91 aminoácidos, que é especificamente inserido entre os domínios FN 7 e 8. Essa sequência de Domínio Extra B da Fibronectina altamente conservada ocorre identicamente em camundongos, ratos, coelhos e humano. Domínio Extra B da Fibronectina é normalmente ausente em tecidos de adulto normais, mas envolvida em remodelação e angiogênese de tecido. Além do mais, o Domínio Extra B da Fibronectina foi encontrado em muitos diferentes tipos de câncer, com padrão de expressão abundante na neovasculatura de diversos tumores sólidos agressivos em humanos

tais como cabeça e pescoço, cérebro e mama.

[004] Para alveijamento de tumores fracamente vascularizados, o grande tamanho dos anticorpos e mesmo de seus fragmentos pode diminuir a taxa de penetração no tecido e por meio disso prejudicar a distribuição eficiente. Além disso, em virtude da circulação sanguínea prolongada de anticorpos, parece que eles não são ideais para uso em diagnóstico, especialmente no contexto de concepções de imagem. Além do que foi dito, a arquitetura molecular de anticorpos, com padrão de glicosilação e ligações de dissulfeto complexos, exige fabricação cara e complexa e complica a funcionalização adicional, por exemplo, por meio de um traçador de imagem. Para superar essas limitações, como uma alternativa a anticorpos assim chamados proteínas de andaime surgiram durante as últimas décadas: Andaimos fornecem um *framework* estrutural robusta para modificar geneticamente com precisão moléculas de interação adequadas para o reconhecimento justo e específico de um dado alvo. A maioria deles enovela adequadamente em condições não redutoras e podem ser expressos em bactérias sem a necessidade de desnaturação e ré-enovelamento. Mesmo síntese química é uma opção para a produção de alguns dos formatos. Finalmente, eles são bem adequados para funcionalização adicional (marcação, oligomerização, fusão com outros peptídeos, etc.) para gerar moléculas de ligação multifuncionais. Dentre as diferentes abordagens baseadas em andaime miniproteínas nó de cistina (“*knottins*”) têm mostrado um grande potencial para o desenvolvimento de agentes de diagnóstico e terapêuticos direcionados. Miniproteínas são pequenos polipeptídeos, de 30–50 aminoácidos, contendo três ligações de dissulfeto que formam a estrutura atada eponímica. A topologia da cistina pseudoatada é responsável por uma extraordinária estabilidade térmica, proteolítica e química, que é desejável para aplicações biomédicas *in vivo*. Por exemplo, sem perder a integridade estrutural e funcional, as miniproteínas podem ser fervidas em ambiente alcalino ou ácido. As regiões de alça restringidas por

dissulfeto toleram ampla diversidade de sequência, fornecendo um *framework* molecular robusta para modificar geneticamente proteínas que reconhecem uma variedade de alvos biomédicos.

[005] Existe uma necessidade na técnica de moléculas de ligação de Domínio Extra B da Fibronectina que são úteis em abordagens de diagnóstico e terapêuticas.

[006] Agentes de ligação de Domínio Extra B da Fibronectina tais como peptídeos de ligação de Domínio Extra B da Fibronectina são descritos aqui que mostram alta especificidade e seletividade para Domínio Extra B da Fibronectina de humano. Os agentes de ligação de Domínio Extra B da Fibronectina descritos aqui são excelentes ferramentas para aplicações de diagnóstico, particularmente para formação de imagem de tumor, e aplicações terapêuticas pelo direcionamento eficiente do ambiente tumoral.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] De acordo com a invenção, uma variante de cadeia aberta do inibidor de tripsina II tipo *knottin* da *Momordica cochinchinensis* (oMCoTI-II) foi usada como um andaime molecular para modificar geneticamente uma proteína de ligação específica de Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina. Para isso, uma biblioteca de fagos baseada em inibidor de tripsina II de *Momordica cochinchinensis* (oMCoTI-II) foi usada para selecionar miniproteínas nó de cistina contra Domínio Extra B da Fibronectina recombinante. Miniproteínas nó de cistina modificadas geneticamente, MC-FN-010 e um derivado MC-FN-016, caracterizam Domínio Extra B da Fibronectina com alta especificidade, bem como afinidades razoáveis. Oligomerização química dos ligantes e conjugação de corante de fluorescência direcionado para o sítio aumentaram a força de ligação enormemente, retendo ainda sua alta especificidade, e permitiram a formação de imagem *in vivo* em um modelo de camundongo de glioblastoma de enxerto baseado em U-87

MG. Ambas as moléculas de ligação de Domínio Extra B da Fibronectina apresentaram forte acúmulo no tumor e baixos sinais de fundo, exceto para os rins. Nossos resultados demonstram o alto potencial de miniproteínas nó de cistina como andaimes moleculares para tecnologias de formação de imagem de tumor.

[008] A presente invenção no geral fornece compostos úteis para o tratamento e/ou diagnóstico de doenças que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina tais como doenças de câncer. Esses compostos permitem a detecção seletiva de células que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina e/ou erradicação de células que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina e/ou de células que são associadas com um ambiente, em que o Domínio Extra B da Fibronectina é expresso tais como células que são associadas com células que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina. A presente invenção permite minimizar efeitos adversos em células normais que não expressam o Domínio Extra B da Fibronectina e/ou nem são associadas com um ambiente, em que o Domínio Extra B da Fibronectina é expresso.

[009] A presente invenção fornece um peptídeo de ligação do Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina que compreende o motivo da sequência de aminoácidos Arg-Ile/Val-Arg.

[0010] Em uma modalidade, o Peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina compreende o motivo da sequência de aminoácidos Arg-Ile/Val-Arg-Leu.

[0011] Em uma modalidade, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina compreende as sequências de aminoácidos:

(Xaa)_{n1} Cys (Xaa)_{n2} Arg Ile/Val Arg (Xaa)_{n3} Cys (Xaa)_{n4}
Cys (Xaa)_{n5} Cys (Xaa)_{n6} Cys (Xaa)_{n7} Cys (Xaa)_{n8}

em que

os resíduos Cys formam uma estrutura de nó de cistina,

Xaa é independentemente um do outro qualquer aminoácido e

n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, e n8 são os respectivos números de aminoácidos,

em que natureza dos aminoácidos Xaa e/ou o número de aminoácidos n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7 e n8 são de maneira tal que uma estrutura de nó de cistina possa se formar entre os resíduos Cys.

[0012] Em uma modalidade do peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina:

n1 é 0 a 4, preferivelmente 1 ou 2,

n2 é 3 a 10, preferivelmente 4, 5, 6 ou 7,

n3 é 0 a 4, preferivelmente 0 ou 1,

n4 é 3 a 7, preferivelmente 4, 5 ou 6,

n5 é 2 a 6, preferivelmente 2, 3 ou 4,

n6 é 1 a 3, preferivelmente 1 ou 2,

n7 é 3 a 7, preferivelmente 4, 5 ou 6, e

n8 é 0 a 4, preferivelmente 1 ou 2.

[0013] Em uma modalidade do peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina (Xaa)n3 é Leu ou está ausente, preferivelmente (Xaa)n3 é Leu. Em uma modalidade do peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina (Xaa)n2 é (Xaa)n2' Asn, em que preferivelmente n2' é 2 a 9, preferivelmente 3, 4, 5 ou 6. Em uma modalidade do peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina (Xaa)n7 é Arg (Xaa)n7', em que preferivelmente n7' é 2 a 6, preferivelmente 3, 4 ou 5.

[0014] Em uma modalidade do peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina:

n_2 é 5 ou 6 ou n_2' é 4 ou 5,

n_3 é 0 ou 1,

n_4 é 5,

n_5 é 3,

n_6 é 1, e

n_7 é 5 ou n_7' é 4.

[0015] Em uma modalidade, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina compreende a sequência de aminoácidos:

(Xaa) n_1 Cys (Xaa) n_2 Arg Ile/Val Arg (Xaa) n_3 Cys Arg Asp Ser Asp Cys (Xaa) n_5 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys (Xaa) n_8

[0016] Em uma modalidade, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina compreende a sequência de aminoácidos:

(Xaa) n_1 Cys (Xaa) n_2 Arg Ile/Val Arg (Xaa) n_3 Cys Arg Asp Ser Asp Cys (Xaa) n_5 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly

[0017] Em uma modalidade do peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina Ile/Val é Ile. Em uma modalidade do peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina Ile/Val é Val.

[0018] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um Peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina, que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

(i) TrpLysCysGlnProThrAsnGlyTyrArgIleArgCysArgArgAsp SerAspCysProGlyAspCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(ii) SerValCysLysAsnValSerIleMetArgIleArgLeuCysArgArgAsp SerAspCysProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(iii) SerValCysAlaHisTyrAsnThrIleArgValArgLeuCysArgArg

AspSerAspCysProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(iv) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(v) SerValCysLysGlnAlaAsnPheValArgIleArgLeuCysArgArg
AspSerAspCysProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(vi) AlaMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(vii) ProAlaCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(viii) ProMetCysAlaGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(ix) ProMetCysThrAlaArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(x) ProMetCysThrGlnAlaLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(xi) ProMetCysThrGlnArgAlaAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(xii) ProMetCysThrGlnArgLysAlaArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(xiii) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysAlaArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly, e

(xiv) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgAlaAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly

[0019] Em uma modalidade, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina forma ou é parte de um andaime. Em uma modalidade, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina é

estabilizado por uma modificação covalente. Em uma modalidade, a modificação covalente é ciclização. Em uma modalidade, a ciclização é por meio de uma ou mais ligações de dissulfeto.

[0020] Em uma modalidade, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina forma e/ou é parte de uma estrutura de nó de cistina, preferivelmente estrutura de nó de cistina inibidor. Em uma modalidade, o motivo da sequência de aminoácidos é localizado na alça 1 de uma estrutura de nó de cistina, preferivelmente a estrutura de nó de cistina inibidor, preferivelmente na extremidade C-terminal da alça 1 de uma estrutura de nó de cistina, preferivelmente a estrutura de nó de cistina inibidor. Em uma modalidade, a estrutura de nó de cistina é baseada no inibidor de cadeia aberta de tripsina II de *Momordica cochinchinensis* (oMCoTI-II).

[0021] Em uma modalidade, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina compreende adicionalmente pelo menos um parceiro de fusão. Em uma modalidade, o parceiro de fusão compreende uma sequência de aminoácidos heteróloga.

[0022] A invenção também fornece um agente de ligação do Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina compreendendo um peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui. A invenção também fornece um agente de ligação do Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina compreendendo um ou mais tais como 2, 3, 4, 5, 6 ou mais peptídeos de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descritos aqui, em que os peptídeos de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina podem ser idênticos ou diferentes.

[0023] Em uma modalidade do agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina é covalentemente e/ou não covalentemente, preferivelmente covalentemente, associado com pelo menos uma fração adicional.

[0024] Em uma modalidade do peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina ou do agente de ligação do Domínio Extra B da

Fibronectina, o parceiro de fusão ou fração adicional compreende uma proteína transportadora, marcador, repórter ou etiqueta. Em uma modalidade, o repórter é um repórter para um ensaio imunológico, em que o repórter preferivelmente é selecionado do grupo que consiste em fosfatase alcalina, peroxidase do rábano silvestre, ou uma molécula fluorescente. Em uma modalidade, o parceiro de fusão ou fração adicional é selecionado do grupo que consiste em um cassete His6, tiorredoxina, um S-tag, biotina ou uma combinação dos mesmos.

[0025] Em uma modalidade, o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina compreende pelo menos duas subunidades que são covalentemente e/ou não covalentemente associadas, cada uma das ditas subunidades compreendendo um peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui, em que os peptídeos de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina podem ser idênticos ou diferentes.

[0026] De acordo com a invenção, em uma modalidade, a associação é por meio de um composto compreendendo estreptavidina. De acordo com a invenção, em uma modalidade, a associação covalente é por meio de ligantes peptídicos e/ou não peptídicos.

[0027] Dessa forma, em uma modalidade, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina da invenção está presente na forma oligomérica ou multimérica. Nessa modalidade, dois ou mais peptídeos de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina da invenção que podem ser idênticos ou diferentes podem ser ligados ou acoplados por ligação covalente ou não covalente, tal como através de biotina/estreptavidina. Dessa forma, os peptídeos de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina da invenção podem formar dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc.

[0028] Em uma modalidade, o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina da invenção compreende pelo menos quatro subunidades. Em uma modalidade, o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina da invenção compreende pelo menos três subunidades.

[0029] A invenção também fornece um agente de ligação do Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina que compreende o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui covalentemente e/ou não covalentemente, preferivelmente covalentemente, associado com pelo menos um marcador ou repórter detectável e/ou pelo menos uma fração de efector terapêutico.

[0030] Em uma modalidade, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui se liga a epítomos nativos do Domínio Extra B da Fibronectina.

[0031] Em uma modalidade, o Domínio Extra B da Fibronectina é expresso por células endoteliais e/ou células de tumor.

[0032] Em uma modalidade do peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui ligando é uma ligação específica.

[0033] A presente invenção também fornece um ácido nucléico recombinante que codifica um peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui. Em uma modalidade, o ácido nucléico recombinante é na forma de um vetor ou na forma de RNA.

[0034] A presente invenção também fornece uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucléico recombinante descrito aqui.

[0035] Um outro objetivo da invenção é fornecer meios e métodos para diagnóstico, detecção ou monitoramento, isto é, determinação da regressão, progressão, curso e/ou início de ação de uma doença que expressa o Domínio Extra B da Fibronectina tal como uma doença de câncer.

[0036] A presente invenção fornece um kit de teste compreendendo o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui. Em uma modalidade, o kit de teste compreende adicionalmente

pelo menos um reagente adicional para realizar um imunoenensaio e/ou instruções para uso do kit para realizar um imunoenensaio. Em uma modalidade, o kit de teste é um kit de teste de diagnóstico.

[0037] Kit de teste de diagnósticos da invenção pode ser útil nos métodos para diagnóstico, detecção ou monitoramento de câncer da invenção. Esses kits podem incluir panfletos informativos, por exemplo, panfletos informando como se usam os reagentes para praticar um método descrito aqui.

[0038] A presente invenção também fornece um dispositivo de ensaio compreendendo o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui. Em uma modalidade, o dispositivo de ensaio é um dispositivo de ensaio imunoabsorvente ligado a enzima. Em uma modalidade do dispositivo de ensaio, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina ou Agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina é liberavelmente ou não liberavelmente imobilizado em um suporte sólido.

[0039] A presente invenção também fornece um método para ensaiar quanto a presença e/ou quantidade de Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina em uma amostra compreendendo usar o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui.

[0040] A presente invenção também fornece um método para diagnóstico, detecção ou monitoramento de câncer em um paciente compreendendo ensaiar quanto a presença e/ou quantidade de Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina no dito paciente usando o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui.

[0041] Em um aspecto particular, a invenção se refere a um método para detecção, isto é, determinação da posição ou sítio, de uma doença de câncer, por exemplo, um tecido ou órgão particular. Em uma

modalidade, o dito método compreende administrar um composto de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina, por exemplo, peptídeo ou agente de ligação, da invenção que é acoplado a um marcador detectável a um paciente.

[0042] Marcação de um tecido ou órgão no dito paciente pode indicar a presença ou risco de uma doença de câncer no dito tecido ou órgão.

[0043] Em uma modalidade, o tecido ou órgão é um tecido ou órgão que, quando o tecido ou órgão não tem câncer, não expressa substancialmente o Domínio Extra B da Fibronectina.

[0044] Em uma modalidade dos métodos da invenção, o dito ensaio é realizado em uma amostra biológica isolada do dito paciente.

[0045] Em uma modalidade, a amostra biológica é isolada de um paciente com uma doença de câncer, que é suspeito de ter ou ficar doente com uma doença de câncer, ou tem um potencial para uma doença de câncer. Em uma modalidade, a amostra biológica é de um tecido ou órgão que, quando o tecido ou órgão não tem câncer, não expressa substancialmente o Domínio Extra B da Fibronectina.

[0046] Tipicamente, o nível do Domínio Extra B da Fibronectina em uma amostra biológica é comparado a um nível de referência, em que um desvio em relação ao dito nível de referência é indicativo da presença e/ou estágio de uma doença de câncer em um paciente. O nível de referência pode ser um nível determinado em uma amostra de controle (por exemplo, de um tecido ou sujeito sadio) ou um nível mediano de sujeitos sadios. Um “desvio” em relação ao dito nível de referência designa qualquer mudança significativa, tal como um aumento ou diminuição em pelo menos 10%, 20%, ou 30%, preferivelmente em pelo menos 40% ou 50%, ou mesmo mais. A presença de Domínio Extra B da Fibronectina e/ou uma quantidade de Domínio Extra B da Fibronectina que é aumentado comparado a um nível de referência, por exemplo, comparado a um paciente sem uma doença de câncer, pode indicar a presença ou risco de (isto é, um

potencial para um desenvolvimento de) uma doença de câncer no dito paciente.

[0047] Em uma modalidade, uma amostra biológica e/ou uma amostra de controle/referência é de um tecido ou órgão correspondente ao tecido ou órgão que deve ser diagnosticado, detectado ou monitorado com relação a afeição por uma doença de câncer; por exemplo, a doença de câncer que deve ser diagnosticada, detectada ou monitorada é câncer de cérebro e a amostra biológica e/ou amostra de controle/referência é tecido do cérebro.

[0048] Em uma modalidade, a amostra biológica e/ou uma amostra de controle/referência é de um tecido ou órgão que, quando o tecido ou órgão é livre de câncer, não expressa substancialmente o Domínio Extra B da Fibronectina. A indicação da presença ou risco de uma doença de câncer em um paciente pelos métodos da invenção pode indicar que a doença de câncer é no dito tecido ou órgão ou que o dito tecido ou órgão está em risco da dita doença de câncer.

[0049] Os métodos para diagnóstico, detecção ou monitoramento permitem avaliações quantitativas e/ou qualitativas, por exemplo, medida absoluta e/ou relativa das moléculas alvos, por exemplo, níveis de expressão do Domínio Extra B da Fibronectina.

[0050] Meios para obter o dito ensaio quanto a presença e/ou quantidade do Domínio Extra B da Fibronectina são descritos aqui e ficarão aparentes aos versados na técnica. Tipicamente, o ensaio nos métodos da invenção envolve o uso de ligantes marcados que especificamente se ligam ao Domínio Extra B da Fibronectina, por exemplo, um composto da invenção que se liga especificamente ao Domínio Extra B da Fibronectina diretamente ou indiretamente ligado a um marcador que permite detecção, por exemplo, enzimas indicadoras, radiomarcadores, fluoróforos, ou partículas paramagnéticas.

[0051] Em uma modalidade, a presença de Domínio Extra B da Fibronectina ou uma quantidade do Domínio Extra B da Fibronectina que é maior comparada a uma referência sem câncer indica que o

paciente tem câncer.

[0052] Os métodos de monitoramento de acordo com a invenção preferivelmente compreendem ensaiar quanto a presença e/ou quantidade do Domínio Extra B da Fibronectina em uma primeira amostra em um primeiro ponto de tempo e em uma amostra adicional em um segundo ponto de tempo, em que a regressão, progressão, curso e/ou início de ação de uma doença de câncer pode ser determinado comprando as duas amostras.

[0053] Uma quantidade de Domínio Extra B da Fibronectina que é diminuída em uma amostra biológica comparada a uma amostra biológica retirada anteriormente de um paciente pode indicar uma regressão, um curso positivo, por exemplo, um tratamento bem sucedido, ou um risco reduzido para um início de ação de uma doença de câncer no dito paciente.

[0054] Uma quantidade de Domínio Extra B da Fibronectina que é aumentada em uma amostra biológica comparada a uma amostra biológica retirada anteriormente de um paciente pode indicar uma progressão, um curso negativo, por exemplo, um tratamento mal sucedido, comportamento recorrente ou metastático, um início de ação ou um risco de para um início de ação de uma doença de câncer no dito paciente.

[0055] Em uma modalidade dos métodos da invenção, ensaiar quanto a presença e/ou quantidade de Domínio Extra B da Fibronectina compreende:

(i) colocar uma amostra em contato com o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina, e

(ii) detectar a formação e/ou determinar a quantidade de um complexo entre o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina e Domínio Extra B da Fibronectina.

[0056] Em uma modalidade dos métodos da invenção, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina compreende ou é conjugado a pelo menos um marcador ou repórter detectável.

[0057] Em uma modalidade, o método da invenção é realizado no contexto de um imunoensaio.

[0058] Em uma modalidade dos métodos da invenção, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina é liberavelmente ou não liberavelmente imobilizado em um suporte sólido.

[0059] A ligação de um composto de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina de acordo com a invenção ao Domínio Extra B da Fibronectina pode interferir na função do Domínio Extra B da Fibronectina. Além disso, um composto de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina pode ser ligado às frações efetoras terapêuticas, por exemplo, radiomarcadores, citosinas, enzimas citotóxicas, e similares, e a ligação do composto ao Domínio Extra B da Fibronectina pode seletivamente alvejar e exterminar células que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina ou células que são associadas com células que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina, em particular, células cancerígenas. Em uma modalidade, o dito composto reduz o crescimento de célula tumorígena e/ou induz a morte de célula tumorígena e, dessa forma, tem um efeito de inibição de tumor ou destruição de tumor. Dessa forma, os compostos de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descritos aqui podem ser usados em terapia, em particular, para um tratamento profilático e/ou terapêutico de doenças de câncer.

[0060] Um diagnóstico positivo de uma doença de câncer como aqui descrito usando os métodos da presente invenção pode indicar uma doença de câncer que é sensível aos métodos de tratamento descrito aqui.

[0061] Dessa forma, um outro objetivo da invenção é fornecer

meios e métodos para tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença de câncer.

[0062] A presente invenção também fornece uma composição farmacêutica compreendendo o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui, o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui, o ácido nucléico recombinante descrito aqui ou a célula hospedeira descrita aqui.

[0063] Uma composição farmacêutica da invenção pode compreender um transportador farmacêuticamente aceitável e pode opcionalmente compreender substâncias adicionais descritas aqui.

[0064] A presente invenção também fornece o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui, o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui, o ácido nucléico recombinante descrito aqui, a célula hospedeira descrita aqui ou a composição farmacêutica descrita aqui para uso em terapia, em particular para uso no tratamento ou prevenção de câncer em um paciente.

[0065] A presente invenção também fornece o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui para uso no alívio de câncer em um paciente.

[0066] A presente invenção também fornece um método para tratamento de um paciente compreendendo administrar ao paciente o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui, o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui, o ácido nucléico recombinante descrito aqui, a célula hospedeira descrita aqui ou a composição farmacêutica descrita aqui, em que, preferivelmente, o paciente tem câncer ou está em risco de desenvolver câncer.

[0067] Em uma modalidade dos aspectos apresentados, o peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina ou o agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina compreende ou é conjugado a pelo

menos uma fração de efetor terapêutico.

[0068] Em uma modalidade dos aspectos apresentados, o câncer é Domínio Extra B da Fibronectina-positivo e/ou envolve células que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina.

[0069] De acordo com todos os aspectos da invenção, o câncer é preferivelmente selecionado do grupo que consiste em câncer de mama, câncer de cérebro, câncer pulmonar ou de pulmão, câncer colorretal, câncer de cólon, câncer do esôfago, câncer da cabeça ou pescoço, câncer do estômago, câncer de pâncreas, câncer de rim, câncer do cérvix, câncer do ovário, câncer da bexiga, ou câncer de próstata.

[0070] De acordo com todos os aspectos da invenção, o Domínio Extra B da Fibronectina preferivelmente compreende a sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2 da listagem de sequência ou uma variante da dita sequência de aminoácidos.

[0071] Em um aspecto, a invenção fornece agentes como descrito aqui para uso nos métodos de tratamento descritos aqui. Em uma modalidade, a invenção fornece uma composição farmacêutica como descrito aqui para uso nos métodos de tratamento descritos aqui.

[0072] Os tratamentos descritos aqui podem ser combinados com ressecção cirúrgica e/ou quimioterapia por radiação e/ou tradicional.

[0073] Outras características e vantagens da invenção em questão ficarão aparentes a partir da descrição detalhada seguinte e Reivindicações.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0074] Embora a presente invenção seja descrita em detalhe a seguir, deve-se entender que essa invenção não é limitada às metodologias, protocolos e reagentes particulares descritos aqui, já que esses podem variar. Deve-se também entender que a terminologia usada aqui é apenas para efeitos de descrição de modalidades particulares, e não visa limitar o escopo da presente invenção, que será limitado apenas pelas Reivindicações anexas. A menos que definido de

outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm os mesmos significados normalmente entendidos pelos versados na técnica.

[0075] A seguir, os elementos da presente invenção serão descritos. Esses elementos são listados com modalidades específicas, entretanto, deve-se entender que eles podem ser combinados de qualquer maneira e em qualquer número para criar modalidades adicionais. Os exemplos descritos de forma variada e modalidades preferidas não devem ser interpretados para limitar a presente invenção apenas às modalidades explicitamente descritas. Essa descrição deve ser entendida de forma a suportar e englobar modalidades que combinam as modalidades explicitamente descritas com qualquer número dos elementos descritos e/ou preferidos. Além disso, qualquer permutação e combinação de todos os elementos descritos nesse relatório descritivo devem ser considerados descritos pela narração do presente relatório descritivo, a menos que o contexto indique de outra forma.

[0076] Preferivelmente, os termos usados aqui são definidos como descritos em “Um glossário multilíngue de termos biotécnicos: (IUPAC *Recommendations*)”, H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, e H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Suíça, (1995).

[0077] A prática da presente invenção empregará, a menos que de outra forma indicado, métodos convencionais de técnicas químicas, bioquímicas, de biologia celular, imunologia, e DNA recombinante que são explicada na literatura no campo (cf., por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, J. Sambrook *et al.* eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

[0078] Nessa especificação e nas Reivindicações que se seguem, a menos que o contexto exija de outra forma, a palavra “compreender”, e variações tais como “compreende” e “compreendendo”, serão entendidas de forma a implicar a inclusão de um membro, integridade ou etapa ou grupo de membros, integridades ou etapas declarados, mas não a

exclusão de qualquer outro membro, integridade ou etapa ou grupo de membros, integridades ou etapas, embora, em algumas modalidades, tal outro membro, integridade ou etapa ou grupo de membros, integridades ou etapas possam ser excluídos, isto é, a matéria objeto consiste na inclusão de um membro, integridade ou etapa ou grupo de membros, integridades ou etapas declarados. Os termos “um” e “uma” e “o” e “a” e referência similar usada no contexto de descrição da invenção (especialmente no contexto das Reivindicações) devem ser interpretados de forma a cobrir tanto o singular quanto o plural, a menos que de outra forma indicado aqui, ou claramente contradito pelo contexto. A citação de faixas de valores aqui é meramente destinada a servir como um método simplificado de referir-se individualmente a cada valor separado que caia na faixa. A menos que de outra forma indicado aqui, cada valor individual é incorporado na especificação como se fosse individualmente citado aqui. Todos os métodos descritos aqui podem ser realizados em qualquer ordem adequada, a menos que de outra forma indicado ou de outra forma claramente contradito pelo contexto. O uso de qualquer e todos os exemplos, ou linguagem exemplificativa (por exemplo, “tal como”), providos aqui é meramente para ilustrar melhor a invenção e não apresenta uma limitação ao escopo da invenção de outra forma reivindicado. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada indicando qualquer elemento não reivindicado essencial para a prática da invenção.

[0079] Diversos documentos são citados no texto desse relatório descritivo. Cada um dos documentos citados aqui (incluindo todas as patentes, pedidos de patente, publicações científicas, especificações de fabricante, instruções, etc.), quer *supra* ou *infra*, estão por meio disso incorporados pela referência em suas íntegras. Nada aqui deve ser interpretado como uma admissão de que a invenção não é intitulada a antedatar tal descrição em virtude de invenção anterior.

[0080] A presente invenção se refere a compostos de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina ou agentes tais como peptídeos de

ligação do Domínio Extra B da Fibronectina ou agentes compreendendo um ou mais peptídeos de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina.

[0081] Fibronectinas (FNs) são glicoproteínas adesivas de alta massa molecular presentes na matriz extracelular (ECM) e fluidos corpóreos, constituídas por um dímero composto de duas subunidades de cerca de 250 kDa ligadas nos C-terminais por duas ligações de dissulfeto. Cada monômero consiste em três tipos de unidades de repetição: 12 repetições de FN de tipo I (cerca de 40 aminoácidos cada uma), duas tipo II (cerca de 60 aminoácidos) e 15–17 tipo III (cerca de 90 aminoácidos). Fibronectina media uma ampla variedade de interações celulares e é envolvida em inúmeros processos, tal como adesão celular, no estabelecimento e manutenção da morfologia de célula normal, migração, crescimento e diferenciação de célula. Ela interage com diversas outras proteínas ECM e de superfície celular, incluindo colágeno, heparina, fibrina, e receptores de membrana celular. Finalmente, FN pode ser um ligante para inúmeras integrinas, incluindo o receptor FN alfa5-beta1 clássico na sequência RGD da repetição III-10. Fibronectinas são o produto de um único gene localizado no cromossoma 2, mas isoforma diferente surge do *splicing* alternativo do pre-mRNA, um processo que, para algumas proteínas ECM, é modulado por citocinas e pH extracelular/intracelular em três sítios: a sequência de conexão tipo III (IIICS), uma repetição tipo III completa, extra domínio A (EDA), e uma repetição tipo III completa, Domínio Extra B (EDB). A última dessas é uma repetição de homologia tipo III completa de 91 aminoácidos, na qual o uso ou salto de éxon leva a inclusão ou exclusão dessas repetições tipo III. Dessa forma, a isoforma do Domínio Extra B (EDB) compreende um domínio tipo III adicional de 91 aminoácidos, que é especificamente inserido entre domínios 7 e 8 de FN. A inserção do EDB entre as repetições 7 e 8 de FN tipo III induz uma modificação conformacional que desmascara uma sequência críptica e oculta outras. O Domínio Extra B da Fibronectina é normalmente ausente em tecidos de adulto normais, mas envolvido em

remodelação e angiogênese de tecido. Além do mais, o Domínio Extra B da Fibronectina foi encontrado em muitos diferentes tipos de câncer com abundante padrão de expressão na neovasculatura de diversos tumores sólidos agressivos em humanos.

[0082] De acordo com a invenção, a expressão “Domínio Extra B da Fibronectina” preferivelmente se refere a Domínio Extra B da Fibronectina de humano.

[0083] Preferivelmente, a expressão “Domínio Extra B da Fibronectina” ou a abreviação “EDB” se refere a uma certa isoforma de fibronectina contendo uma repetição de Domínio Extra B. Em uma modalidade, a expressão “Domínio Extra B da Fibronectina” ou a abreviação “EDB” se refere a um ácido nucléico compreendendo, preferivelmente consistindo na sequência de ácidos nucléicos de SEQ ID NO: 1 da listagem de sequência ou uma variante da dita sequência de ácidos nucléicos e a uma proteína codificada por esse ácido nucléico, preferivelmente a uma proteína compreendendo, preferivelmente consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 da listagem de sequência ou uma variante da dita sequência de aminoácidos. Em certas modalidades, a expressão “Domínio Extra B da Fibronectina” ou a abreviação “EDB” é também usada aqui para designar especificamente a porção de repetição do Domínio Extra B de Fibronectina EDB. Em uma modalidade, tal porção de repetição do Domínio Extra B de Fibronectina EDB compreende a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 28 da listagem de sequência ou uma variante da dita sequência de aminoácidos.

[0084] O Domínio Extra B da Fibronectina é expresso em cânceres de várias origens tais como câncer da cabeça ou pescoço, câncer de cérebro, câncer colorretal, câncer do pulmão, câncer de próstata e câncer de mama. O Domínio Extra B da Fibronectina é um alvo valioso para o diagnóstico, prevenção e/ou tratamento de tumores primários e metástases.

[0085] Um agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina

da invenção tem a capacidade de se ligar ao Domínio Extra B da Fibronectina, isto é, a capacidade de se ligar a um epítopo presente no Domínio Extra B da Fibronectina. Em uma modalidade, um agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina se liga ao Domínio Extra B da Fibronectina expresso em torno da vasculatura angiogênica, tal como em tumorigênese. Em uma modalidade, um agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina se liga ao Domínio Extra B da Fibronectina expresso no e/ou em torno dos tecidos de tumor tal como na matriz extracelular de tecido de tumores e/ou em e/ou nos vasos do tumor tais como neovasos de tumor. Em modalidades preferidas particulares, um agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina se liga a epítomos nativos do Domínio Extra B da Fibronectina.

[0086] O termo “epítopo” se refere a uma parte ou porção em uma molécula que é reconhecida por um agente de ligação. Por exemplo, epítomos são os sítios discretos tridimensionais em uma molécula, que são reconhecidos por um agente de ligação. Epítomos normalmente consistem em agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e normalmente têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Epítomos conformacionais e não conformacionais são distintos em que a ligação ao primeiro, mas não ao último, se perde na presença de solventes desnaturante. Um epítopo de uma proteína preferivelmente compreende uma porção contínua ou descontínua da dita proteína e tem preferivelmente entre 5 e 100, preferivelmente entre 5 e 50, mais preferivelmente entre 8 e 30, acima de tudo preferivelmente entre 10 e 25 aminoácidos de comprimento, por exemplo, o epítopo pode ter preferivelmente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 aminoácidos de comprimento.

[0087] De acordo com a invenção, a expressão “Agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina” ou “Composto de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina” inclui qualquer composto (incluindo

complexos de moléculas) que tem uma capacidade de ligação ao Domínio Extra B da Fibronectina. Preferivelmente, tal agente de ligação é ou compreende pelo menos um peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina da invenção. Se um agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina compreender pelo menos dois peptídeos de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina da invenção (que podem ser idênticos ou diferentes) esses peptídeos podem ser covalentemente ou não covalentemente associados (isto é, ligados). Os agentes de ligação de Domínio Extra B da Fibronectina podem compreender um ou mais peptídeos de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina covalentemente ou não covalentemente associados a qualquer outro composto ou fração tais como marcadores ou frações efectoras terapêuticas.

[0088] De acordo com a presente invenção, um agente é capaz de se ligar a um alvo predeterminado tal como o Domínio Extra B da Fibronectina se ele tiver uma afinidade significativa para o dito alvo predeterminado e se ligar ao dito alvo predeterminado em ensaios padrões. “Afinidade” ou “afinidade de ligação” é frequentemente medida pela constante de dissociação de equilíbrio (K_D). Preferivelmente, a expressão “afinidade significativa” se refere à ligação a um alvo predeterminado com uma constante de dissociação (K_D) de 10^{-5} M ou menos, 10^{-6} M ou menos, 10^{-7} M ou menos, 10^{-8} M ou menos, 10^{-9} M ou menos, 10^{-10} M ou menos, 10^{-11} M ou menos, ou 10^{-12} M ou menos.

[0089] Um agente não é (substancialmente) capaz de se ligar a um alvo se ele não tiver afinidade significativa para o dito alvo e não se ligar significativamente, em particular, não se ligar de forma detectável, ao dito alvo em ensaios padrões. Preferivelmente, o agente não se liga de forma detectável ao dito alvo se presente em uma concentração de até 2, preferivelmente 10, mais preferivelmente 20, em particular 50 ou 100 $\mu\text{g/ml}$ ou mais. Preferivelmente, um agente não tem afinidade significativa para um alvo se ele se ligar ao dito alvo com uma K_D que é pelo menos 10 vezes, 10^2 vezes, 10^3 vezes, 10^4 vezes, 10^5 vezes, ou 10^6

vezes maior que a K_D para ligação ao alvo predeterminado ao qual o agente é capaz de se ligar. Por exemplo, se a K_D para ligação de um agente ao alvo ao qual o agente é capaz de se ligar for 10^{-7} M, a K_D para ligação a um alvo para o qual o agente não tem afinidade significativa seria pelo menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, ou 10^{-1} M.

[0090] De acordo com a invenção, a expressão “ligação” preferivelmente se refere a uma ligação específica.

[0091] “Ligação específica” significa que um agente se liga mais fortemente a um alvo para o qual ele é específico comparado à ligação a um outro alvo. Um agente se liga de maneira mais forte a um primeiro alvo comparado a um segundo alvo se ele se ligar ao primeiro alvo com uma constante de dissociação (K_D) que é menor que a constante de dissociação para o segundo alvo. Preferivelmente, a constante de dissociação (K_D) para o alvo ao qual o agente se liga especificamente é mais que 10^2 vezes, 10^3 vezes, 10^4 vezes, 10^5 vezes, 10^6 vezes, 10^7 vezes, 10^8 vezes, 10^9 vezes, ou 10^{10} vezes menor que a constante de dissociação (K_D) para o alvo ao qual o agente não se liga especificamente.

[0092] Preferivelmente, um agente é específico para um alvo predeterminado tal como o Domínio Extra B da Fibronectina se ele for capaz de se ligar ao dito alvo predeterminado enquanto não é (substancialmente) capaz de se ligar a outros alvos, isto é, não tem afinidade significativa para outros alvos e não se liga significativamente a outros alvos em ensaios padrões. Preferivelmente, um agente é específico para o Domínio Extra B da Fibronectina se a afinidade para e a ligação a tais outros alvos não exceder significativamente a afinidade para ou ligação ao Domínio Extra B das proteínas não relacionadas a Fibronectina tais como albumina sérica bovina (BSA), caseína, albumina sérica de humano (HSA) ou qualquer outro polipeptídeo especificado. Preferivelmente, um agente é específico para um alvo predeterminado se ele se ligar ao dito alvo com uma K_D que é pelo menos 10^2 vezes, 10^3 vezes, 10^4 vezes, 10^5 vezes, 10^6 vezes, 10^7 vezes,

10^8 vezes, 10^9 vezes, ou 10^{10} vezes menor que a K_D para ligação a um alvo para o qual ele não é específico.

[0093] A ligação de um agente a um alvo pode ser determinada experimentalmente usando qualquer método adequado; vide, por exemplo, Berzofsky *et al.*, “Antibody-Antigen Interactions” em *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kubly, Janis *Immunology*, W. H. Freeman e Company New York, N Y (1992), e métodos descritos aqui. Afinidades podem ser facilmente determinadas usando técnicas convencionais, tal como por diálise de equilíbrio; usando análise de ressonância plasmônica de superfície (por exemplo, Biacore), usando procedimentos gerais esboçados pelo fabricante; por radioimunoensaio usando antígeno alvo radiomarcado; ou por um outro método conhecido pelos versados na técnica. Os dados de afinidade podem ser analisados, por exemplo, pelo método de Scatchard *et al.*, *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 51:660 (1949). A afinidade medida de uma interação particular pode variar se medida em diferentes condições, por exemplo, concentração de sal, pH. Dessa forma, medições de afinidade e outros parâmetros de ligação, por exemplo, K_D , IC_{50} , são preferivelmente feitas com soluções padronizadas de agente de ligação e alvo, e um tampão padronizado.

[0094] Em uma modalidade da invenção, um câncer é um câncer do Domínio Extra B da Fibronectina-positivo. De acordo com a invenção, a expressão “Câncer do Domínio Extra B da Fibronectina-positivo” ou termos similares significam um câncer envolvendo ou sendo associado com o Domínio Extra B da Fibronectina, em particular, um câncer envolvendo células tais como células de tumor e/ou células endoteliais que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina. Em uma modalidade, a expressão “Câncer do Domínio Extra B da Fibronectina-positivo” ou termos similares significa um câncer em que Domínio Extra B da Fibronectina é expresso em e/ou em torno do tecido de tumores tal como na matriz extracelular de tecido de tumores e/ou em e/ou nos vasos do tumor tais como neovasos do tumor.

[0095] Em uma modalidade, um câncer envolve ou é associado com o Domínio Extra B da Fibronectina se o Domínio Extra B da Fibronectina for espacialmente ligado ao dito câncer, em particular, se o Domínio Extra B da Fibronectina estiver presente no dito câncer tal como na matriz extracelular de tecido de tumores e/ou em e/ou em vasos de tumor. Preferivelmente, um câncer envolvendo ou sendo associado com o Domínio Extra B da Fibronectina contém células que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina. As ditas células podem ser células cancerígenas ou células sendo associadas com câncer tais como células endoteliais, em particular, células endoteliais associadas ao câncer, tais como células endoteliais de vasos de tumor tais como neovasos de tumor.

[0096] Os termos “parte” ou “fragmento” são usados intercambiavelmente aqui e se referem a um elemento contínuo. Uma parte ou fragmento de uma sequência de proteína preferivelmente compreende pelo menos 6, em particular pelo menos 8, pelo menos 12, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 50, ou pelo menos 100 aminoácidos consecutivos da sequência de proteína.

[0097] O termo “porção” se refere a um elemento contínuo e/ou não contínuo. Uma porção de uma sequência de proteína preferivelmente compreende pelo menos 6, em particular pelo menos 8, pelo menos 12, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 50, ou pelo menos 100 aminoácidos consecutivos e/ou não consecutivos da sequência de proteína.

[0098] De acordo com a invenção, o Domínio Extra B da Fibronectina não é (substancialmente) expresso se o nível de expressão ficar abaixo do limite de detecção e/ou se o nível de expressão for muito baixo para permitir ligação pelos agentes de ligação específicos do Domínio Extra B da Fibronectina.

[0099] De acordo com a invenção, o Domínio Extra B da Fibronectina é expresso se o nível de expressão ficar acima do limite de detecção e/ou se o nível de expressão for alto o bastante para permitir

ligação pelos agentes de ligação específicos do Domínio Extra B da Fibronectina. Preferivelmente, o Domínio Extra B da Fibronectina expresso por uma célula é secretado da célula tal como na matriz extracelular.

[00100] A expressão “andaime” se refere a uma estrutura que confere rigidez, por exemplo, conferindo rigidez a um peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina ou motivo da sequência de aminoácidos descrito aqui.

[00101] Um nó de cistina é um motivo de proteína estrutural contendo pelo menos três ligações de dissulfeto (formadas de pares de moléculas de cisteína). Ele compreende um anel embutido formado por duas ligações de dissulfeto e seus segmentos de espinha dorsal de conexão que é encadeada por uma terceira ligação de dissulfeto. Essa estrutura é preferivelmente associada com uma estrutura de folhas beta. Peptídeos contendo um nó de cistina têm preferivelmente 25-60, preferivelmente 25-50 ou 25-40 resíduos de aminoácidos de comprimento.

[00102] Nós de cistina ocorrem em muitos peptídeos ou proteínas através de muitas espécies e fornecem considerável estabilidade estrutural. Existem três tipos de nós de cistina, que diferem na topologia das ligações de dissulfeto: Fator de Crescimento Nó de cistina (GFCK), nó de cistina Inibidor (ICK) e nó de cistina cíclico, ou ciclotídeo.

[00103] Um nó de cistina Inibidor (ICK) ou *knottin* é um motivo de proteína estrutural contendo três ligações de dissulfeto. Junto com as seções de polipeptídeo entre eles, dois dissulfetos (ligando a primeira e quarta cisteína e a segunda e quinta cisteína, respectivamente) formam uma alça através da qual a terceira ligação de dissulfeto (ligando a terceira e sexta cisteínas na sequência) passa, formando um nó. O motivo é comum em toxinas de invertebrados, tais como as de aracnídeos e moluscos. O motivo é também encontrado em algumas proteínas inibidoras encontradas em plantas.

[00104] Dessa forma, de acordo com a invenção, um motivo ICK

envolve dois segmentos de espinha dorsal intracisteína e suas ligações de dissulfeto de conexão, CysI-CysIV e CysII-CysV, que formam um anel que é penetrado pela terceira ligação de dissulfeto, CysIII-CysVI.

[00105] O motivo ICK é similar ao nó de cistina cíclico ou ciclotídeo, mas falta a ciclização da espinha dorsal do polipeptídeo que está presente nessa última família. O Fator de Crescimento nó de cistina (GFCK) compartilha o motivo, mas sua topologia é tal que ela é ligada entre as primeiras e quartas cisteínas que passam através da alça (formada entre as segundas e quintas cisteínas e as terceira e sexta cisteínas, respectivamente).

[00106] Os ciclotídeos caem em duas subfamílias estruturais principais. Ciclotídeos Moebius, a menos comum das duas, contêm uma cis-prolina na alça 5 que induz uma torção na espinha dorsal local de 180°, ao passo que ciclotídeos braceletes não. Os ciclotídeos inibidores de tripsina são classificados em sua própria família com base na variação de sequência e atividade natural. Inibidor de tripsina ciclotídeos são mais homólogos para uma família de inibidores de tripsina não cíclicos de plantas esmagadas conhecidas como *knottins* ou nós de cistina inibidor do que eles são para outros ciclotídeos.

[00107] MCoTI-I e MCoTI-II são polipeptídeos naturais das sementes da cabaça espinhosa *Momordica cochinchinensis*. Esses polipeptídeos são inibidores de proteases tipo tripsina e contêm uma alça adicional conectando os terminos amino e o carbóxi e um arranjo atado de três ligações de dissulfeto conservadas. O nó de cistina é definido por três ligações de dissulfeto intramoleculares, onde CysI-CysIV e CysII-CysV da sequência de peptídeo linear forma um anel que é penetrado pela terceira ligação de dissulfeto, CysIII-CysVI. Esse arranjo fornece um andaime bem definido e extremamente estável que apresenta extraordinária capacidade térmica e proteolítica. Por causa da similaridade estrutural e atividade biológica comum, isto é, inibição de proteases da família tripsina, MCoTI-I e MCoTI-II foram agrupados na família de nó de cistina Inibidor (ICK) espremida de pequenos inibidores

de protease. Membros dessa família são moléculas de cadeia aberta que formam uma pequena folha β de três fitas e uma hélice curta 3_{10} , agrupadas por três ligações de dissulfeto intramoleculares para dar origem a um *framework* de nó de cistina. MCoTI-I e MCoTI-II são os únicos membros conhecidos da grande família de inibidores espremidos que são cíclicos. Variantes de cadeia aberta de MCoTI-II que faltam a alça de ciclização foram sintetizados.

[00108] Em certas modalidades, um peptídeo de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina descrito aqui forma e/ou é parte de uma estrutura de nó de cistina, preferivelmente estrutura de nó de cistina inibidor. Em certas modalidades, um motivo da sequência amino descrito aqui é parte de uma estrutura de nó de cistina, preferivelmente estrutura de nó de cistina inibidor. Em uma modalidade, um motivo da sequência de aminoácidos descrito aqui é localizado na alça 1 de uma estrutura de nó de cistina, preferivelmente estrutura de nó de cistina inibidor. Em uma modalidade, um motivo da sequência de aminoácidos descrito aqui é localizado na extremidade C-terminal da alça 1 de uma estrutura de nó de cistina, preferivelmente estrutura de nó de cistina inibidor. Em uma modalidade, a primeira alça (alça 1) de uma estrutura de nó de cisteína é localizada entre a primeira cisteína e a segunda cisteína da estrutura de nó de cistina.

[00109] De acordo com a invenção, os peptídeos descritos aqui podem ser sinteticamente produzidos por métodos de síntese química que são bem conhecidos na técnica, tanto como um peptídeo isolado quanto como uma parte de um outro peptídeo ou polipeptídeo. Alternativamente, um peptídeo pode ser produzido em um micro-organismo que produz o peptídeo que é então isolado e, se desejado, adicionalmente purificado. Dessa forma, o peptídeo pode ser produzido em micro-organismos tais como bactérias, levedura ou fungos; em células eucarióticas tais como células de mamífero ou inseto; ou, em um vetor viral recombinante tais como adenovírus, poxvírus, herpesvírus, vírus de floresta Simliki, baculovírus, bacteriófago, vírus

sindbis, ou vírus sendai. Bactérias adequadas para produzir o peptídeo incluem *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, ou qualquer outra bactéria que é capaz de expressar peptídeos. Tipos de levedura adequados para expressar o peptídeo incluem, mas sem limitação *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, ou qualquer outra levedura capaz de expressar peptídeos. Métodos para usar as bactérias, vetores virais recombinantes, células eucarióticas supramencionadas para produzir peptídeos são bem conhecidos na técnica.

[00110] Para produzir um peptídeo, o ácido nucléico que codifica o peptídeo é preferivelmente em um plasmídeo e o ácido nucléico é operacionalmente ligado a um promotor que afeta a expressão do peptídeo em um micro-organismo. Promotores adequados incluem, mas sem limitação, promotor do fago T7, promotor do fago T3, promotor de β -galactosidase, e o promotor do fago Sp6. Os métodos para isolar e purificar peptídeos são bem conhecidos na técnica e incluem métodos tais como filtração em gel, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, ou centrifugação.

[00111] Os peptídeos da invenção, tanto por si próprios quanto como parte de um peptídeo de fusão, podem ser conjugados em um peptídeo ou proteína heteróloga. Tais proteínas heterólogas incluem, mas sem limitação proteínas transportadoras tais como albumina de soro bovino (BSA), e enzimas repórteres que incluem, mas sem limitação peroxidase do rábano silvestre ou fosfatase alcalina. Adicionalmente, os peptídeos ou peptídeos de fusão compreendendo o peptídeo podem ser quimicamente conjugados nas moléculas repórteres fluorescentes que incluem, mas sem limitação, fluoresceína ou R-ficoeritrina. Métodos para conjugar proteínas transportadoras, enzimas, e moléculas repórteres fluorescentes a peptídeos e peptídeos de fusão são bem conhecidos na técnica.

[00112] Para facilitar o isolamento do peptídeo, um polipeptídeo de fusão pode ser feito em que o peptídeo é transaccionalmente fundido (covalentemente ligado) a um marcador heteróloga tal como um

polipeptídeo ou poli-histidina heteróloga, preferivelmente seis resíduos de histidina, que permite a recuperação simplificada do polipeptídeo de fusão, por exemplo, seu isolamento por cromatografia de afinidade ou cromatografia de afinidade com metal, preferivelmente cromatografia de afinidade com níquel. Em alguns casos, pode ser desejável remover o marcador após purificação. Portanto, é também contemplado que o polipeptídeo de fusão compreenda um sítio de clivagem na junção entre o peptídeo e o marcador heterólogo. O sítio de clivagem consiste em uma sequência de aminoácidos que é clivada com uma enzima específica para a sequência de aminoácidos no sítio.

[00113] Os agentes de ligação de Domínio Extra B da Fibronectina descritos aqui podem ser usados em ensaios para ensaiar a presença ou quantidade de Domínio Extra B da Fibronectina ou anticorpos do Domínio Extra B da Fibronectina. Tais ensaios podem ser realizados de inúmeras maneiras, incluindo, mas sem limitação imunodeteção, e incluem ELISA, em particular ensaios de ligação de peptídeo ELISA, ensaios de ligação competitiva, RIA e similares. Os métodos da invenção permitem avaliações quantitativas e/ou qualitativas, por exemplo, avaliações absolutas e/ou relativas, de Domínio Extra B da Fibronectina ou anticorpos de Domínio Extra B da Fibronectina.

[00114] Em geral, os ensaios são realizados usando uma modalidade de ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA).

[00115] A expressão “ensaio imunoabsorvente ligado da enzima, ou ELISA”, na forma usada aqui, se refere a um método para determinar quantitativamente ou semiquantitativamente concentrações de proteína de uma amostra, por exemplo, plasma de sangue, extratos de soro ou célula/tecido, em um formato de placa de múltiplos poços (normalmente 96-poços por placa). No geral, proteínas em solução são adsorvidas nas placas de ELISA. Anticorpos específicos para a proteína de interesse podem ser usados para sondar a placa. O fundo é minimizado pela otimização de métodos de bloqueio e lavagem (como para IHC), e a especificidade é assegurada por meio da presença de

controles positivos e negativos. Os métodos de detecção são normalmente colorimétricos ou baseados quimioluminescência.

[00116] Uma placa microtituladora pode ser provida contendo uma pluralidade de poços em que um primeiro poço ou série de poços contém um anticorpo monoclonal contra Domínio Extra B da Fibronectina immobilizado na superfície d mesmo. Uma amostra pode ser adicionada aos poços contendo o anticorpo monoclonal ligado. O Domínio Extra B da Fibronectina na amostra se liga ao anticorpo monoclonal. O ELISA é incubado por um tempo suficiente para os complexos de anticorpo se formarem. Um peptídeo da invenção pode ser posteriormente adicional. O peptídeo pode ser parte de um polipeptídeo de fusão. Em seguida, os poços são lavados para remover todo material não ligado. Os poços podem então ser incubados com um anticorpo marcado ou um anticorpo conjugado a uma molécula repórter que se liga ao polipeptídeo de fusão para formar um complexo que pode ser detectado. Um sinal detectável do marcador ou repórter indica que a amostra contém Domínio Extra B da Fibronectina, enquanto uma ausência de um sinal pode indicar que a amostra não contém o Domínio Extra B da Fibronectina. Quando o polipeptídeo de fusão compreende um marcador ou molécula repórter tal como uma enzima repórter tal como fosfatase alcalina, o complexo de anticorpo pode ser detectado diretamente sem a necessidade de um anticorpo marcado.

[00117] Alternativamente, uma placa microtituladora pode ser provida contendo uma pluralidade de poços em que um primeiro poço ou série de poços contém o peptídeo da invenção, que pode ser conjugado a uma proteína transportadora ou polipeptídeo de fusão, immobilizada na superfície da mesma. A amostra pode ser adicionada aos poços contendo os peptídeos ligados. O Domínio Extra B da Fibronectina na amostra e o peptídeo ligado às superfícies do poço são incubados por um tempo suficiente para os complexos ser formarem. Em seguida, os poços são lavados para remover todo material não ligado. A quantidade de Domínio Extra B da Fibronectina que é ligada

aos peptídeos imobilizados no poço é determinada incubando os poços com um anticorpo marcado ou um anticorpo conjugado a uma molécula repórter que se liga ao Domínio Extra B da Fibronectina para formar um complexo que pode ser detectado. Um sinal detectável pelo repórter indica que a amostra contém Domínio Extra B da Fibronectina, enquanto uma ausência de um sinal indica que a amostra não contém o Domínio Extra B da Fibronectina. A intensidade do sinal pode fornecer uma estimativa da concentração de Domínio Extra B da Fibronectina na amostra.

[00118] Os peptídeos da invenção podem também ser usados em métodos para detectar a presença de anticorpos contra o Domínio Extra B da Fibronectina. O projeto de imunoenensaio adequado para colocar esses métodos em prática pode ser sujeito a uma grande quantidade de variação, e uma variedade desses imunoenseaios é conhecida na técnica. Protocolos de imunoenensaio adequados podem ser baseados, por exemplo, em competição, ou reação direta, ou ensaios tipo sanduiche. Os protocolos de imunoenensaio usados podem também, por exemplo, usar suportes sólidos, ou podem ser por imunoprecipitação. Ensaios podem envolver o uso dos peptídeos marcados e os marcadores podem ser, por exemplo, fluorescentes, quimioluminescentes, radioativos, ou moléculas corantes. Ensaios preferidos particulares são imunoenseaios marcados e mediados por enzima, tais como ensaios ELISA.

[00119] Dessa forma, os peptídeos podem também ser usados em um ensaio tal como um ensaio ELISA para determinar anticorpo contra o Domínio Extra B da Fibronectina em uma amostra. Para esse propósito, os poços de placas de ELISA podem ser revestidos com peptídeos. O Domínio Extra B da Fibronectina e o peptídeo ligado às superfícies de poço podem ser incubados por um tempo suficiente para os complexos se formarem. Subsequentemente, uma amostra tal como plasma pode ser adicionada e a detecção dos anticorpos específicos do Domínio Extra B da Fibronectina e (anticorpo primário) pode ser feita com um anticorpo secundário marcado direcionado contra o anticorpo

primário.

[00120] Quando usado como um reagente de ensaio como descrito aqui, um peptídeo da invenção pode ser conjugado a um marcador.

[00121] De acordo com a invenção, um marcador é qualquer entidade cuja presença pode ser facilmente detectada. Preferivelmente, marcador é um marcador direto. Marcadores diretos são entidades que, em seu estado natural, são facilmente visíveis tanto a olho nu quanto com a ajuda de um filtro óptico e/ou estimulação aplicada, por exemplo, luz UV, para promover fluorescência. Exemplos incluem compostos radioativos, quimioluminescente, eletroativos (tais como marcadores redox) e fluorescentes. Marcadores de particulados diretos, tais como sols corantes, sols metálicas (por exemplo, ouro) e partículas de látex coloridas, são também muito adequadas e são, juntamente com compostos fluorescentes, preferidos. Dessas opções, partículas de látex coloridas e compostos fluorescentes são acima de tudo preferidos. A concentração de marcador em uma zona ou volume pequeno deve dar origem a um sinal facilmente detectável, por exemplo, uma área fortemente colorida. Marcadores indiretos, tais como enzimas, por exemplo, fosfatase alcalina e peroxidase do rábano silvestre, podem também ser usados, embora esses normalmente exijam a adição de um ou mais reagentes de revelação tais como substratos antes de um sinal visível poder ser detectado.

[00122] De acordo com a invenção, um marcador pode funcionar para: (i) fornecer um sinal detectável; (ii) interagir com um segundo marcador para modificar o sinal detectável fornecido pelo primeiro ou segundo marcador, por exemplo, FRET (Transferência de Energia de Ressonância por Fluorescência); (iii) afetar a mobilidade, por exemplo, mobilidade eletroforética, por carga, hidrofobicidade, formato, ou outros parâmetros físicos, ou (iv) fornecer uma fração de captura, por exemplo, afinidade, anticorpo/antígeno, ou complexação iônica. Adequados como marcador são estruturas, tais como marcadores fluorescentes, marcadores luminescentes, marcadores de cromóforo, marcadores

radioisotópicos, marcadores isotópicos, preferivelmente marcadores isotópicos estáveis, marcadores isobáricos, marcadores de enzima, marcadores de partícula, em particular marcadores de partícula metálica, marcadores de partícula magnética, marcadores de partícula de polímero, moléculas orgânicas pequenas tal como biotina, ligantes de receptores ou moléculas de ligação tais como proteínas ou lectinas de adesão celular, marcador-sequências compreendendo ácidos nucleicos e/ou resíduos de aminoácidos que podem ser detectados pelo uso de agentes de ligação, etc. Os marcadores compreendem, de uma maneira não limitante, sulfato de bário, ácido iocetâmico, ácido iopanóico, ipodato de cálcio, diatrizoato de sódio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sódio e radiodiagnóstico, incluindo emissores de pósitrons tais como flúor-18 e carbono-11, emissores gama tais como iodo-123, tecnécio-99m, iodo-131 e índio-111, núclídeos para ressonância magnética nuclear, tais como flúor e gadolínio. Em modalidades preferidas, um marcador compreende um radionuclídeo tais como lutécio-177 ou gálio-68 que podem ser complexados com um ligante tal como DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético) ligado a um agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina.

[00123] A conjugação do marcador ao peptídeo da invenção pode ser por ligação covalente ou não covalente (incluindo hidrofóbica), ou por adsorção. Técnicas para tal conjugação são corriqueiras na técnica e podem ser facilmente adaptadas para os reagentes particulares empregados.

[00124] O termo “amostra”, na forma usada aqui, inclui qualquer amostra biológica que pode ser isolada de um paciente e usada para efeitos de análise. A dita amostra pode ser uma amostra de fluido corpóreo, uma amostra de tecido, ou uma amostra de célula. Por exemplo, amostras englobadas pela presente invenção são amostras de tecido (por exemplo, seção ou explante), amostra de células simples, amostras de colônia de células, amostras de cultura de célula, amostras

de sangue (por exemplo, sangue total ou fração de sangue tal como fração de célula de sangue, soro ou plasma), amostras de urina, ou amostras de outras fontes periféricas. As ditas amostras podem ser misturadas ou agrupadas, por exemplo, uma amostra pode ser uma mistura de uma amostra de sangue e uma amostra de urina. As ditas amostras podem ser fornecidas pela remoção de um fluido corpóreo, célula(s), colônias de células, um explante, ou uma seção de um paciente, mas podem também ser fornecidas usando uma amostra previamente isolada. Por exemplo, uma amostra de tecido pode ser removida de um paciente por técnicas de biópsia convencionais ou uma amostra de sangue pode ser retirada de um paciente por técnicas de coleta de sangue convencionais. A amostra, por exemplo, amostra de tecido ou amostra de sangue, pode ser obtida de um paciente antes do início do tratamento terapêutico, durante o tratamento terapêutico, e/ou após o tratamento terapêutico.

[00125] Em uma modalidade, a amostra é uma amostra de fluido corpóreo. A expressão “amostra de fluido corpóreo”, na forma usada aqui, se refere a qualquer amostra de líquido derivado do corpo de um paciente. A dita amostra de fluido corpóreo pode ser uma amostra de sangue, amostra de urina, amostra de sputa, amostra de leite da mama, fluido amostra cerebrospinal (CSF), amostra de cerume (cera dos ouvidos), amostra da endolinfa, amostra da perilinfa, amostra de suco gástrico, amostra de muco, amostra de fluido peritoneal, amostra de fluido pleural, amostra de saliva, amostra de sebo (óleo da pele), amostra de sêmen, amostra de suor, amostra de lágrimas, amostra de secreção vaginal, ou amostra de vômito incluindo componentes ou frações dos mesmos. As ditas amostras de fluido corpóreo podem ser misturadas ou agrupadas. Dessa forma, uma amostra de fluido corpóreo pode ser uma mistura de um sangue e uma amostra de urina ou uma mistura de uma amostra de sangue e fluido cerebrospinal. A dita amostra de fluido corpóreo pode ser fornecida removendo um líquido corpóreo de um paciente, mas pode também ser fornecida

usando material de amostra de fluido corpóreo previamente isolada.

[00126] Em uma modalidade preferida, a amostra é uma amostra de sangue total ou uma amostra de fração de sangue tais como uma amostra de fração de célula do sangue, soro de sangue, ou plasma de sangue.

[00127] Em uma modalidade, uma amostra biológica é uma amostra obtida de um tecido suspeito de ser afetado com uma doença tal como câncer. Em uma modalidade, uma amostra biológica é uma amostra de tumor, por exemplo, uma amostra obtida de um tumor e compreendendo células de tumor e/ou estroma de tumor tal como matriz extracelular ou componentes de matriz extracelular. De acordo com a invenção, a expressão “amostra biológica” também inclui amostras biológicas processadas tais como frações ou isolados de amostras biológicas, por exemplo, isolados de ácido nucléico e peptídeo/proteína.

[00128] De acordo com a invenção, uma “referência” tal como uma amostra de referência ou organismo de referência pode ser usada para correlacionar e comparar os resultados obtidos nos métodos da invenção de uma amostra de teste ou organismo de teste, isto é, um paciente. Tipicamente, o organismo de referência é um organismo sadio, em particular um organismo que não sofre uma doença tumorigênica.

[00129] Um “valor de referência” ou “nível de referência” pode ser determinado a partir de uma referência empiricamente medindo um número suficientemente grande de referências. Preferivelmente, o valor de referência é determinado medindo pelo menos 2, preferivelmente pelo menos 3, preferivelmente pelo menos 5, preferivelmente pelo menos 8, preferivelmente pelo menos 12, preferivelmente pelo menos 20, preferivelmente pelo menos 30, preferivelmente pelo menos 50, ou preferivelmente pelo menos 100 referências.

[00130] “Reduzir”, “diminuir” ou “inibir” na forma usada aqui significam uma diminuição geral ou a capacidade de causar uma diminuição geral, preferivelmente de 5% ou mais, 10% ou mais, 20% ou

mais, mais preferivelmente de 50% ou mais, e acima de tudo preferivelmente de 75% ou mais, no nível, por exemplo, no nível de expressão ou no nível de proliferação de células. A quantidade de uma substância é também reduzida em uma amostra de teste tal como uma amostra biológica comparada a uma amostra de referência se ela for detectável na amostra de referência, mas ausente ou não detectável na amostra de teste.

[00131] Termos tais como “aumentar” ou “intensificar” preferivelmente se referem a um aumento ou intensificação em cerca de pelo menos 10%, preferivelmente pelo menos 20%, preferivelmente pelo menos 30%, mais preferivelmente pelo menos 40%, mais preferivelmente pelo menos 50%, ainda mais preferivelmente pelo menos 80%, e acima de tudo preferivelmente pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 500%, pelo menos 1000%, pelo menos 10000% ou mesmo mais. A quantidade de uma substância é também aumentada em uma amostra de teste tal como uma amostra biológica comparada a uma amostra de referência se ela for detectável na amostra de teste, mas ausente ou não detectável na amostra de referência.

[00132] Agentes de ligação de Domínio Extra B da Fibronectina tais como peptídeos da invenção podem ser ligados a um suporte sólido, por exemplo, a superfície de um poço de imunensaio ou sonda, e/ou embalada em kits em um recipiente adequado juntamente com reagentes, controles, instruções adequados e similares.

[00133] Dessa maneira, a presente invenção também fornece um kit compreendendo pelo menos um agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina da presente invenção. Em uma modalidade preferida, o kit compreende adicionalmente pelo menos um agente adicional tais como um ou mais reagentes adequados para realizar um imunensaio, um controle, ou instruções para uso do kit.

[00134] De acordo com a invenção, é adicionalmente fornecido um dispositivo de ensaio compreendendo pelo menos um agente de ligação

do Domínio Extra B da Fibronectina da presente invenção. Em uma modalidade, o dispositivo de ensaio é selecionado do grupo que consiste em um dispositivo de ensaio imunoabsorvente ligado a enzima.

[00135] Um dispositivo como esse pode assumir uma forma diferente, e pode ser variado dependendo da natureza precisa do ensaio que está sendo feito. Por exemplo, o peptídeo da invenção pode ser revestido em um suporte sólido, tipicamente nitrocelulose ou outro material poroso hidrofóbico. Alternativamente, o peptídeo pode ser revestido em um material de plástico sintético, placa de ensaio de microtitulação, chip de microarranjo, microesferas de látex, filtro compreendendo um material polimérico celulósico ou sintético, lâmina de vidro ou plástico, sonda, dispositivo de enchimento capilar e similares. O revestimento dos peptídeos nessas superfícies pode ser feito por métodos conhecidos na técnica. Transportadores de proteína são tipicamente usados para complexação, com BSA ou peptídeos adesivos sendo os acima de tudo preferidos. Em uma modalidade, o peptídeo da invenção é liberavelmente imobilizado no suporte sólido. Em uma modalidade preferida adicional, o peptídeo da invenção é imobilizado de forma não liberável no suporte sólido.

[00136] Deve-se entender que os peptídeos descritos aqui podem ser distribuídos em um paciente administrando um ácido nucléico tal como RNA que codifica o peptídeo e/ou administrando uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucléico tal como RNA que codifica o peptídeo. Dessa forma, um ácido nucléico que codifica um peptídeo quando administrado a um paciente pode estar presente na forma nua ou em um veículo de entrega adequado tal como na forma de lipossomas ou partículas virais, ou dentro de uma célula hospedeira. O ácido nucléico fornecido pode produzir o peptídeo em períodos de tempo prolongados de uma maneira sustentada. Ácidos nucléicos a serem entregues a um paciente podem ser produzidos por meios recombinantes. Se um ácido nucléico for administrado a um paciente sem estar presente em uma célula hospedeira, ele é preferivelmente

absorvido pelas células do paciente para expressão do peptídeo codificado pelo ácido nucléico. Se um ácido nucléico for administrado a um paciente enquanto está presente em uma célula hospedeira, ele é preferivelmente expresso pela célula hospedeira no paciente de maneira a produzir o peptídeo codificado pelo ácido nucléico.

[00137] A expressão “ácido nucléico”, na forma usada aqui, deve incluir ácido deoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) tais como DNA genômico, cDNA, mRNA, recombinantemente produzidos e moléculas quimicamente sintetizadas. Um ácido nucléico pode ser RNA de fita simples ou fita dupla. RNA inclui RNA transcrito *in vitro* (IVT RNA) ou RNA sintético.

[00138] Na forma usada aqui, o termo “RNA” significa uma molécula compreendendo resíduos de ribonucleotídeo. Entende-se por “ribonucleotídeo” um nucleotídeo com um grupo hidroxila na posição 2’ de uma fração beta-D-ribo-furanose. O termo inclui RNA de fita dupla, RNA de fita simples, RNA isolado tal como RNA parcialmente purificado, RNA essencialmente puro, RNA sintético, RNA recombinantemente produzido, bem como RNA alterado que difere de RNA de ocorrência natural pela adição, deleção, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleotídeos. Tais alterações podem incluir a adição de material não nucleotídeo, tal como na(s) extremidade(s) de um RNA, ou internamente, por exemplo, em um ou mais nucleotídeos do RNA. Nucleotídeos em moléculas de RNA podem também compreender nucleotídeos não padrões, tais como nucleotídeos de ocorrência não natural ou nucleotídeos ou desoxinucleotídeos quimicamente sintetizados. Esses RNAs alterados podem ser referidos como análogos ou análogos de RNA de ocorrência natural.

[00139] De acordo com a presente invenção, o termo “RNA” inclui e preferivelmente se refere a “mRNA” que significa “RNA mensageiro” e se refere a um “transcrito” que pode ser produzido usando DNA como molde e codifica um peptídeo ou proteína. O mRNA tipicamente compreende uma região não traduzida 5’ (5’-UTR), uma região de

codificação de proteína ou peptídeo e uma região não traduzida 3' (3'-UTR). Em uma modalidade da invenção, o RNA é obtido por transcrição *in vitro* ou síntese química. Preferivelmente, o mRNA é produzido por transcrição *in vitro* usando um molde de DNA. A metodologia de transcrição *in vitro* é conhecida pelos versados na técnica. Por exemplo, existe uma variedade de kits de transcrição *in vitro* comercialmente disponíveis.

[00140] A fim de aumentar a expressão e/ou estabilidade do RNA usado de acordo com a presente invenção, ele pode ser modificado, preferivelmente sem alterar a sequência do peptídeo ou proteína expressos.

[00141] O termo “modificação” no contexto de RNA na forma usada de acordo com a presente invenção inclui qualquer modificação de RNA que não está naturalmente presente no dito RNA.

[00142] Em uma modalidade da invenção, o RNA usado de acordo com a invenção não tem 5'-trifosfatos não capeados. A remoção de tais 5'-trifosfatos não capeados pode ser obtida tratando RNA com uma fosfatase.

[00143] O RNA de acordo com a invenção pode ter ribonucleotídeos modificado de ocorrência natural ou sintético a fim de aumentar sua estabilidade e/ou diminuir a citotoxicidade. Por exemplo, em uma modalidade, no RNA usado de acordo com a invenção, 5-metilcitidina é usado parcialmente ou completamente, preferivelmente completamente, em substituição a citidina. Alternativamente, ou adicionalmente, em uma modalidade, no RNA usado de acordo com a invenção, pseudouridina é usada parcialmente ou completamente, preferivelmente completamente, em substituição a uridina.

[00144] Em uma modalidade, o termo “modificação” se refere a fornecer um RNA com um 5'-cap ou análogo de 5'-cap. O termo “5'-cap” se refere a uma estrutura de capeamento encontrada na extremidade 5' de uma molécula de mRNA e em geral consiste em um nucleotídeo de guanosina conectado ao mRNA por meio de uma ligação de trifosfato 5'

a 5' não usual. Em uma modalidade, essa guanossina é metilada na posição 7. O termo “5'-cap convencional” se refere a um 5'-cap de RNA de ocorrência natural, preferivelmente na 7-metilguanossina cap (m7G). No contexto da presente invenção, a expressão “5'-cap” inclui um análogo de 5'-cap que se parece com a estrutura de cap de RNA e é modificado para possuir a capacidade de estabilizar RNA se ligado a ele, preferivelmente *in vivo* e/ou em uma célula.

[00145] A provisão de um RNA com um 5'-cap ou análogo de 5'-cap pode ser obtida por transcrição *in vitro* de um molde de DNA na presença do dito 5'-cap ou análogo de 5'-cap, em que o dito 5'-cap é co-transcripcionalmente incorporado na fita de RNA gerada, ou o RNA pode ser gerado, por exemplo, por transcrição *in vitro*, e o 5'-cap pode ser ligado ao RNA pós-transcripcionalmente usando enzimas de capeamento, por exemplo, enzimas de capeamento do vírus vaccínia.

[00146] O RNA pode compreender modificações adicionais. Por exemplo, uma modificação adicional do RNA usado na presente invenção pode ser uma extensão ou truncação da cauda poli(A) de ocorrência natural ou uma alteração das regiões 5'- ou 3' não traduzidas (UTR) tal como a introdução de uma UTR que não é relacionada à região de codificação do dito RNA, por exemplo, a inserção de uma ou mais, preferivelmente duas cópias de uma 3'-UTR derivada de um gene de globina, tais como alfa2-globina, alfa1-globina, beta-globina, preferivelmente beta-globina, mais preferivelmente beta-globina de humano.

[00147] No contexto da presente invenção, o termo “transcrição” se refere a um processo, em que o código genético em uma sequência de DNA é transcrito no RNA. Subsequentemente, o RNA pode ser traduzido em proteína. De acordo com a presente invenção, o termo “transcrição” compreende “transcrição *in vitro*”, em que a expressão “transcrição *in vitro*” se refere a um processo em que o RNA, em particular mRNA, é sintetizado *in vitro* em um sistema sem célula, preferivelmente usando extratos de célula apropriados. Preferivelmente, vetores de clonagem são

aplicados para a geração de transcritos. Esses vetores de clonagem são geralmente designados como vetores de transcrição e são de acordo com a presente invenção englobados pelo termo “vetor”.

[00148] O termo “tradução” de acordo com a invenção se refere ao processo nos ribossomos de uma célula pelo qual uma fita de RNA mensageiro direciona a montagem de uma sequência de aminoácidos para produzir um peptídeo ou proteína.

[00149] O termo “expressão” é usado de acordo com a invenção em seu significado mais geral e compreende a produção de RNA e/ou peptídeos ou proteínas, por exemplo, por transcrição e/ou tradução. Com relação a RNA, o termo “expressão” ou “tradução” se refere em particular à produção de peptídeos ou proteínas. Também compreende expressão parcial de ácido nucléicos. Além disso, a expressão pode ser transiente ou estável. De acordo com a invenção, o termo expressão também inclui uma “expressão aberrante” ou “expressão anormal”.

[00150] “Expressão aberrante” ou “expressão anormal” significa de acordo com a invenção que a expressão é alterada, preferivelmente aumentada, comparada a uma referência, por exemplo, um estado em um sujeito que não tem uma doença associada com expressão aberrante ou anormal de uma certa proteína, por exemplo, Domínio Extra B da Fibronectina. Um aumento na expressão se refere a um aumento em pelo menos 10%, em particular pelo menos 20%, pelo menos 50%, pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 500%, pelo menos 1.000%, pelo menos 10.000%, ou mais. Em uma modalidade, a expressão só é encontrada em um tecido doente, enquanto a expressão em um tecido sadio é reprimida.

[00151] A expressão “especificamente expressa” significa que uma proteína essencialmente só é expressa em um tecido ou órgão específico. Por exemplo, uma proteína especificamente expressa na mucosa gástrica significa que a dita proteína é basicamente expressa na mucosa gástrica e não é expressa em outros tecidos ou não é expressa a um valor significativo em outros tipos de tecido ou órgão. Dessa forma,

uma proteína que é exclusivamente expressa em células da mucosa gástrica e a um valor significativamente menor em qualquer outro tecido, tal como testículo, é especificamente expressa em células da mucosa gástrica.

[00152] De acordo com a invenção, a expressão “ácido nucléico que codifica” significa que o ácido nucléico, se presente no ambiente apropriado, preferivelmente em uma célula, pode ser expresso para produzir uma proteína ou peptídeo que ele codifica.

[00153] Os ácidos nucléicos descritos de acordo com a invenção foram preferivelmente isolados. A expressão “ácido nucléico isolado” significa de acordo com a invenção que o ácido nucléico foi (i) amplificado *in vitro*, por exemplo, por reação em cadeia de polimerase (PCR), (ii) recombinantemente produzido por clonagem, (iii) purificado, por exemplo, por clivagem e fracionamento eletroforético em gel, ou (iv) sintetizado, por exemplo, por síntese química. Um ácido nucléico isolado é um ácido nucléico que é disponível para manipulação por técnicas de DNA recombinante.

[00154] O termo “variante” com relação, por exemplo, a sequência de ácido nucléico e aminoácidos, de acordo com a invenção inclui qualquer variante, em particular mutantes, variantes de *splice*, conformações, isoforma, variantes alélicas, variantes de espécies e homólogos de espécies, em particular as que são naturalmente presentes. Uma variante alélica se refere a uma alteração na sequência normal de um gene, cuja significância é frequentemente pouco nítida. Sequenciamento genético completo frequentemente identifica inúmeras variantes alélicas para um dado gene. Um homólogo de espécie é uma sequência de ácido nucléico ou aminoácidos com uma espécie diferentes de origem desse de uma dada sequência de ácido nucléico ou aminoácidos.

[00155] Com relação a moléculas de ácido nucléico, o termo “variante” inclui sequências de ácidos nucléicos degeneradas, em que um ácido nucléico degenerado de acordo com a invenção é um ácido

nucléico que difere de um ácido nucléico de referência na sequência de códons por causa da degeneração do código genético.

[00156] Além disso, uma “variante” de uma sequência de ácidos nucléicos específica de acordo com a invenção inclui sequências de ácidos nucléicos compreendendo simples ou múltiplas, tais como pelo menos 2, pelo menos 4, ou pelo menos 6 e preferivelmente até 3, até 4, até 5, até 6, até 10, até 15, ou até 20, substituições, deleções e/ou adições de nucleotídeo.

[00157] Preferivelmente, o grau de identidade entre uma dada sequência de ácidos nucléicos e uma sequência de ácidos nucléicos que é uma variante da dita sequência de ácidos nucléicos será pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%. O grau de identidade é dado preferivelmente para uma região que é pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou cerca de 100% de todo o comprimento da sequência de ácidos nucléicos de referência. Por exemplo, se a sequência de ácidos nucléicos de referência consistir em 200 nucleotídeos, o grau de similaridade ou identidade é dado preferivelmente para pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 40, pelo menos cerca de 60, pelo menos cerca de 80, pelo menos cerca de 100, pelo menos cerca de 120, pelo menos cerca de 140, pelo menos cerca de 160, pelo menos cerca de 180, ou cerca de 200 nucleotídeos, preferivelmente nucleotídeos contínuos. Em modalidades preferidas, o grau de identidade é dado para todo o comprimento da sequência de ácidos nucléicos de referência.

[00158] “Identidade de sequência” entre duas sequências de ácidos nucléicos indica a porcentagem de nucleotídeos que são idênticos entre as sequências.

[00159] A expressão “identidade percentual” é para denotar uma

porcentagem de nucleotídeos que são idênticos entre as duas sequências a serem comparadas, obtida após o melhor alinhamento, essa porcentagem sendo meramente estatística e as diferenças entre as duas sequências sendo distribuídas aleatoriamente e por todo seu comprimento. Comparações de sequências entre duas sequências de nucleotídeos são convencionalmente realizadas comparando essas sequências após elas terem sido alinhadas de forma ideal, a dita comparação sendo realizada por segmento ou por “janela de comparação” a fim de identificar e comparar regiões locais de similaridade de sequência. O alinhamento ideal das sequências para comparação pode ser produzido, além de manualmente, por meio do algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, por meio do algoritmo de homologia local de Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, por meio do método de pesquisa de similaridade de Pearson e Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, ou por meio de programas de computador que usam esses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N e TFASTA em Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

[00160] A identidade percentual é calculada determinando o número de posições idênticas entre as duas sequências que são comparadas, dividindo esse número pelo número de posições comparadas e multiplicando o resultado obtido por 100 de maneira a obter a identidade percentual entre essas duas sequências.

[00161] Preferivelmente, uma dada sequência de ácidos nucleicos e uma sequência de ácidos nucleicos que é uma variante da dita dada sequência de ácidos nucleicos será capaz de hibridizar.

[00162] Um ácido nucleico é “capaz de hibridizar” ou “hibridiza” em um outro ácido nucleico se as duas sequências forem complementares uma à outra. Um ácido nucleico é “complementar” a um outro ácido nucleico se as duas sequências forem capazes de formar um duplex estável um com o outro. De acordo com a invenção, hibridização é

preferivelmente realizada em condições que permitem hibridização específica entre polinucleotídeos (condições rigorosas). Condições rigorosas são descritas, por exemplo, em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook *et al.*, Editors, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ou *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, Editors, John Wiley & Sons, Inc., New York e referência, por exemplo, a hibridização a 65°C em tampão de hibridização (3,5 x SSC, 0,02% Ficoll, 0,02% polivinilpirrolidona, 0,02% albumina sérica bovina, 2,5 mM NaH₂PO₄ (pH 7), 0,5% SDS, 2 mM EDTA). SSC é cloreto de sódio 0,15 M/citrato de sódio 0,15 M, pH 7. Após hibridização, a membrana para a qual o DNA foi transferido é lavada, por exemplo, em 2 x SSC à temperatura ambiente e então em 0,1-0,5 x SSC/0,1 x SDS à temperaturas de até 68°C.

[00163] Uma complementariedade percentual indica a porcentagem de resíduos contíguos em uma molécula de ácido nucléico que pode formar ligações de hidrogênio (por exemplo, pareamento de base de Watson-Crick) com uma segunda sequência de ácidos nucléicos (por exemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 sendo 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% complementar). “Perfeitamente complementar” ou “totalmente complementar” significa que todos os resíduos contíguos de uma sequência de ácidos nucléicos se ligarão a hidrogênio com o mesmo número de resíduos contíguos em uma segunda sequência de ácidos nucléicos. Preferivelmente, o grau de complementariedade de acordo com a invenção é pelo menos 70%, preferivelmente pelo menos 75%, preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90% ou acima de tudo preferivelmente pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%. Acima de tudo preferivelmente, o grau de complementariedade de acordo com a invenção é 100%.

[00164] O termo “derivado” compreende qualquer derivatização química de um ácido nucléico em um base de nucleotídeo, no açúcar ou

no fosfato. O termo “derivado” também compreende ácidos nucleicos que contêm nucleotídeos e análogos de nucleotídeo que não ocorrem naturalmente. Preferivelmente, uma derivatização de um ácido nucleico aumenta sua estabilidade.

[00165] Ácidos nucleicos podem, de acordo com a invenção, estar presentes sozinhos ou em combinação com outros ácidos nucleicos, em particular, ácidos nucleicos heterólogos. Preferivelmente, um ácido nucleico que codifica para um peptídeo ou proteína expressa o dito peptídeo ou proteína. Em modalidades preferidas, um ácido nucleico é funcionalmente ligado às sequências de controle de expressão ou sequências regulatórias que podem ser homólogas ou heterólogas com relação ao dito ácido nucleico. Uma sequência de codificação e uma sequência regulatória são “funcionalmente” ligadas uma à outra se elas forem covalentemente ligadas uma à outra de uma maneira tal que a expressão ou transcrição da dita sequência de codificação fique sob o controle ou sob a influência da dita sequência regulatória. Se a sequência de codificação tiver que ser traduzida em uma proteína funcional, então, com uma sequência regulatória funcionalmente ligada à dita sequência de codificação, indução da dita sequência regulatória resulta em transcrição da dita sequência de codificação, sem causar uma mudança de quadro na sequência de codificação ou a dita sequência de codificação não sendo capaz de ser traduzida na proteína ou peptídeo desejado.

[00166] A expressão “sequência de controle de expressão” ou “sequência regulatória” compreende de acordo com a invenção promotores, intensificadores e outros elementos de controle que regulam a expressão de um gene. Em modalidades particulares da invenção, as sequências de controle de expressão podem ser reguladas. A exata estrutura de sequências regulatórias pode variar em função das espécies ou tipo de célula, mas em geral compreende sequências 5’ não transcritas e 5’ não traduzidas que são envolvidas na iniciação de transcrição e tradução, respectivamente, tal como TATA box, sequência

de capeamento, sequência CAAT, e similares. Mais especificamente, sequências regulatórias 5' não transcrita compreendem uma região promotora que inclui uma sequência promotora para controle transcricional do gene funcionalmente ligado. As sequências regulatórias podem também compreender sequências intensificadoras ou sequências ativadoras à montante.

[00167] De acordo com a invenção, um ácido nucléico pode além disso estar presente em combinação com um outro ácido nucléico que codifica para um peptídeo que controla secreção da proteína ou peptídeo codificado pelo dito ácido nucléico de uma célula hospedeira. De acordo com a invenção, um ácido nucléico pode também estar presente em combinação com um outro ácido nucléico que codifica para um peptídeo fazendo com que a proteína ou peptídeo codificado seja ancorado na membrana celular da célula hospedeira ou compartimentalizado em organelas particulares da dita célula. Similarmente, uma combinação com um ácido nucléico é possível que representa um gene repórter ou qualquer “tag”.

[00168] Em uma modalidade preferida, uma molécula de ácido nucléico recombinante é de acordo com a invenção um vetor, onde apropriado com um promotor, que controla a expressão de um ácido nucléico. O termo “vetor” é usado aqui em seu significado mais geral e compreende qualquer veículo intermediário para um ácido nucléico que permite que o dito ácido nucléico, por exemplo, seja introduzido em células procarióticas e/ou eucarióticas e, onde apropriado, seja integrado em um genoma. Vetores desse tipo são preferivelmente replicados e/ou expressos nas células. Um veículo intermediário pode ser adaptado, por exemplo, ao uso em eletroporação, em bombardeamento com microprojéteis, em administração iposomal, na transferência com a ajuda de agrobactérias ou na inserção por meio de vírus de DNA ou RNA. Vetores compreendem plasmídeos, fagemídeos, bacteriófagos ou genomas virais.

[00169] Os ácidos nucléicos de acordo com a invenção podem ser

usados para transfecção de células hospedeiras. Ácido nucléicos aqui significam tanto DNA quanto RNA recombinante. RNA recombinante pode ser preparado por transcrição *in vitro* de um molde de DNA. Além disso, ele pode ser modificado por sequências de estabilização, capeamento e poliadenilação antes da aplicação.

[00170] O termo “recombinante” no contexto da presente invenção significa “produzido por engenharia genética”. Preferivelmente, um “objeto recombinante” tal como um ácido nucléico recombinante no contexto da presente invenção não é de ocorrência natural.

[00171] A expressão “de ocorrência natural” na forma usada aqui se refere ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, um peptídeo ou ácido nucléico que está presente em um organismo (incluindo vírus) e pode ser isolado de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado pelo homem em laboratório é de ocorrência natural.

[00172] O termo “célula” ou “célula hospedeira” preferivelmente se refere a uma célula intata, isto é, uma célula com uma membrana intata que não liberou seus componentes intracelulares normal tais como enzimas, organelas, ou material genético. Uma célula intata preferivelmente é uma célula viável, isto é, uma célula viva capaz de realizar suas funções metabólicas normais. Preferivelmente, o dito termo se refere de acordo com a invenção a qualquer célula que pode ser transfectada com um ácido nucléico exógeno. Preferivelmente, a célula quando transfectada com um ácido nucléico exógeno pode expressar o ácido nucléico.

[00173] A expressão “célula hospedeira” compreende de acordo com a invenção células procarióticas (por exemplo, *E. coli*) ou eucarióticas (por exemplo, células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células de levedura e células de inseto). Preferência particular é dada a células de mamíferos tais como células de humanos, camundongos, hamsters, porcos, cabras, primatas. As células podem ser derivadas de uma pluralidade de tipos de tecido e compreendem

células primárias e linhas celulares. Exemplos específicos compreende queratinócitos, leucócitos de sangue periférico, células tronco da medula óssea e células tronco embriônicas. Um ácido nucléico pode estar presente na célula hospedeira na forma de uma única cópia ou de duas ou mais cópias e, em uma modalidade, é expresso na célula hospedeira.

[00174] O termo “peptídeo” compreende oligo- e polipeptídeos e se refere a substâncias compreendendo dois ou mais, preferivelmente 3 ou mais, preferivelmente 4 ou mais, preferivelmente 6 ou mais, preferivelmente 8 ou mais, preferivelmente 10 ou mais, preferivelmente 13 ou mais, preferivelmente 16 mais, preferivelmente 21 ou mais e ainda preferivelmente 8, 10, 20, 30, 40 ou 50, em particular 100 aminoácidos unidos covalentemente por ligações de peptídeo. O termo “proteína” se refere a grandes peptídeos, preferivelmente a peptídeos com mais que 100 resíduos de aminoácidos, mas em geral os termos “peptídeos” e “proteínas” são sinônimos e são usados intercambiavelmente aqui.

[00175] De acordo com a invenção, um peptídeo pode incluir aminoácidos naturais e aminoácidos não naturais. Em uma modalidade, um peptídeo meramente inclui aminoácidos naturais.

[00176] De acordo com a invenção, a expressão “aminoácido não natural” se refere a um aminoácido com uma estrutura diferente das 20 espécies de aminoácido natural. Uma vez que aminoácidos não naturais têm estruturas similares à de aminoácidos naturais, aminoácidos não naturais podem ser classificados como derivados ou análogos dos dados aminoácidos naturais.

[00177] De acordo com a invenção, a expressão “peptídeo cíclico” se refere a um peptídeo ou cadeia de polipeptídeo que forma um anel. Um peptídeo pode ser ciclizado de quatro diferentes maneiras: cabeça-a-cauda (C-término no N-término), cabeça-a-cadeia lateral, cadeia lateral-a-cauda ou cadeia lateral-a-cadeia lateral. Particularmente preferidos de acordo com a invenção são peptídeos contendo dois ou mais resíduos

contendo grupos tiol tais como cisteínas que podem formar pontes de dissulfeto intramolecular dando peptídeos cíclicos.

[00178] De acordo com a invenção, um peptídeo pode ser covalentemente ou não covalentemente ligado a um ou mais outros compostos. Tais compostos incluem composto peptídico tais como peptídeos e proteínas bem como compostos não peptídicos tal como polietileno glicol (PEG).

[00179] Em uma modalidade, os peptídeos descritos aqui são PEGuilados. PEGuilação é o processo de ligação covalente de cadeias de polímero de polietileno glicol (PEG) a uma outra molécula, tal como um peptídeo ou proteína. A ligação covalente de PEG pode “mascarar” o agente em relação sistema imune do hospedeiro (reduzida imunogenicidade e antigenicidade), e aumentar o tamanho hidrodinâmico (tamanho em solução) do agente que prolonga seu tempo circulatório pela redução da depuração renal. PEGuilação pode também fornecer solubilidade em água para fármacos e proteínas hidrofóbicos.

[00180] Preferivelmente, as proteínas e peptídeos descritos de acordo com a invenção foram isolados. As expressões “proteína isolada” ou “peptídeo isolado” significam que a proteína ou peptídeo foram separados de seu ambiente natural. Uma proteína ou peptídeo isolado pode ser em um estado essencialmente purificado. A expressão “essencialmente purificado” significa que a proteína ou peptídeo é essencialmente sem outras substâncias com as quais ele é associado na natureza ou *in vivo*. Tais proteínas e peptídeos podem ser usados, por exemplo, em um ensaio imunológico ou diagnóstico ou como produto terapêutico. As proteínas e peptídeos descritos de acordo com a invenção podem ser isolados de amostras biológicas tais como homogenatos de tecido ou célula e podem também ser expressos recombinantemente em uma pluralidade de sistemas de expressão pro- ou eucarióticos.

[00181] O termo “anticorpo” inclui uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias

leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto, e qualquer molécula compreendendo uma porção de ligação ao antígeno de tal glicoproteína. O termo “anticorpo” inclui anticorpos monoclonais, anticorpos recombinantes, anticorpos de humano, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, moléculas compreendendo fragmentos ou derivados de ligação de anticorpos, incluindo, sem limitação, anticorpos de cadeia simples, por exemplo, scFv’s e fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno tais como fragmentos Fab e Fab’ e também inclui todas as forma recombinantes de anticorpos, por exemplo, anticorpos expressos em procariotos, anticorpos não glicosilados, e qualquer fragmento e derivado de anticorpo de ligação ao antígeno descrito aqui. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como VH) e uma região constante de cadeia pesada. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como VL) e uma região constante de cadeia leve. As regiões VH e VL podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementariedade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de *framework* (FR). Cada VH e VL é composta de três CDRs e quatro FRs, arranjadas do término amino ao término carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

[00182] O preceito dado aqui com relação a sequências de aminoácidos específicas, por exemplo, as mostradas na listagem de sequência, deve ser interpretado também de maneira a se relacionar a variantes das ditas sequências específicas resultantes em sequências que são funcionalmente equivalentes às ditas sequências específicas,

por exemplo, sequências de aminoácidos que apresentam propriedades idênticas ou similares às das sequências de aminoácidos específicas. Uma propriedade importante é reter a ligação a um alvo tal como o Domínio Extra B da Fibronectina.

[00183] Para efeitos da presente invenção, “variantes” de uma sequência de aminoácidos compreendem variantes de inserção de aminoácido, variantes de adição de aminoácido, variantes de deleção de aminoácido e/ou variantes de substituição de aminoácido. Variantes de deleção de aminoácido que compreendem a deleção na extremidade N-terminal e/ou C-terminal da proteína são também denominadas variantes de truncação N-terminal e/ou C-terminal.

[00184] Variantes de inserção de aminoácido compreendem inserções de um único ou dois ou mais aminoácidos em uma sequência de aminoácidos particular. No caso de variantes de sequência de aminoácidos com uma inserção, um ou mais resíduos de aminoácidos são inseridos em um sítio particular em uma sequência de aminoácidos, embora inserção aleatório com classificação apropriada do produto resultante seja também possível.

[00185] Variantes de adição de aminoácido compreendem fusões no amino- e/ou carbóxi-terminal de um ou mais aminoácidos, tais como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, ou mais aminoácidos.

[00186] Variantes de deleção de aminoácido são caracterizadas pela remoção de um ou mais aminoácidos da sequência, tal como pela remoção de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, ou mais aminoácidos. As deleções podem ser em qualquer posição do peptídeo ou proteína.

[00187] Variantes de substituição de aminoácido são caracterizadas por pelo menos um resíduo na sequência sendo removido e um outro resíduo sendo inserido em seu lugar. Preferência é dada às modificações sendo em posições na sequência de aminoácidos que não são conservadas entre proteínas ou peptídeos homólogos e/ou à substituição de aminoácidos com outros com propriedades similares. Preferivelmente, mudanças de aminoácido em variantes de proteína são

mudanças de aminoácido conservativas, isto é, substituições de aminoácidos similarmente carregados ou não carregados. Uma mudança de aminoácido conservativa envolve substituição de um de uma família de aminoácidos que são relacionados em suas cadeias laterais. Aminoácidos de ocorrência natural são geralmente divididos em quatro famílias: ácido (aspartato, glutamato), básico (lisina, arginina, histidina), não polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), e polar não carregada (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina) aminoácidos. Fenilalanina, triptofano, e tirosina são algumas vezes classificados conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

[00188] Preferivelmente, o grau de similaridade, preferivelmente identidade entre uma dada sequência de aminoácidos e uma sequência de aminoácidos que é uma variante da dita dada sequência de aminoácidos será pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%. O grau de similaridade ou identidade é dado preferivelmente para uma região de aminoácido que é pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou cerca de 100% de todo o comprimento da sequência de aminoácidos de referência. Por exemplo, se a sequência de aminoácidos de referência consistir em 200 aminoácidos, o grau de similaridade ou identidade é dado preferivelmente para pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 40, pelo menos cerca de 60, pelo menos cerca de 80, pelo menos cerca de 100, pelo menos cerca de 120, pelo menos cerca de 140, pelo menos cerca de 160, pelo menos cerca de 180, ou cerca de 200 aminoácidos, preferivelmente aminoácidos contínuos. Em modalidades preferidas, o grau de similaridade ou identidade é dado para todo o comprimento da sequência de aminoácidos de referência. O alinhamento para determinar similaridade de sequência,

preferivelmente identidade de sequência, pode ser feito com ferramentas conhecidas na técnica, preferivelmente usando o melhor alinhamento de sequência, por exemplo, usando Align, usando definições padrões, preferivelmente EMBOSS::needle, Matriz: Blosun62, Abertura de Lacuna 10.0, Extensão de Lacuna 0.5.

[00189] A “similaridade de sequência” indica a porcentagem de aminoácidos que tanto são idênticas quanto representam substituições de aminoácido conservativas. A “identidade de sequência” entre duas sequências de aminoácidos indica a porcentagem de aminoácidos que são idênticos entre as sequências.

[00190] A expressão “identidade percentual” é para denotar uma porcentagem de resíduos de aminoácidos que são idênticos entre as duas sequências a serem comparadas, obtida após o melhor alinhamento, essa porcentagem sendo meramente estatística e as diferenças entre as duas sequências sendo distribuídas aleatoriamente e por todo seu comprimento. As comparações de sequências entre duas sequências de aminoácidos são convencionalmente realizadas comparando-se essas sequências após ter alinhado as mesmas de forma ideal, a dita comparação sendo realizada por segmento ou por “janela de comparação” a fim de identificar e comparar regiões de similaridade de sequência locais. O alinhamento ideal das sequências para comparação pode ser produzido, além de manualmente, por meio do algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, por meio do algoritmo de homologia local de Neddleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, por meio do método de pesquisa de similaridade de Pearson e Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, ou por meio de programas de computador que usam esses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N e TFASTA em Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

[00191] A identidade percentual é calculada determinando o número de posições idênticas entre as duas sequências que são

comparadas, dividindo esse número pelo número de posições comparadas e multiplicando o resultado obtido por 100 de maneira a obter a identidade percentual entre essas duas sequências.

[00192] As variantes de peptídeos e aminoácido descritos aqui podem ser facilmente preparadas com a ajuda de técnicas de síntese de peptídeo conhecidas tais como, por exemplo, por síntese de fase sólida (Merrifield, 1964) e métodos similares ou por manipulação de DNA recombinante. A manipulação de sequência de DNAs para preparar proteínas e peptídeos com substituições, inserções ou deleções é descrita em detalhe em Sambrook *et al.* (1989), por exemplo.

[00193] De acordo com a invenção, o termo “peptídeo” ou “proteína” inclui “derivados” de peptídeos e proteínas. Tais derivados são formas modificadas de peptídeos e proteínas. Tais modificações incluem qualquer modificação química e compreendem substituições, deleções e/ou adições simples ou múltiplas de qualquer molécula associada com o peptídeo ou proteína, tais como carboidratos, lipídios, proteínas e/ou peptídeos. O termo “derivado” também se estende a todos os equivalentes químicos funcionais dos ditos peptídeos e proteínas. Preferivelmente, um peptídeo modificado tem maior estabilidade e/ou maior imunogenicidade.

[00194] Os agentes de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina da invenção podem ser usados em abordagens terapêuticas. Para isso, os agentes de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina da invenção podem ser covalentemente e/ou não covalentemente ligados a uma ou mais frações efetoras terapêuticas e/ou combinados com vários componentes para produzir composições farmacologicamente aceitáveis. Os agentes tais como o peptídeo descrito aqui podem ser administrados na forma de qualquer composição farmacêutica adequada.

[00195] “Célula alvo” deve significar qualquer célula indesejável tal como uma célula cancerígena. Em modalidades preferidas, a célula alvo é associada com ou espacialmente ligada, por exemplo, em proximidade, ao Domínio Extra B da Fibronectina, por exemplo, a célula

alvo está presente em um câncer ou tumor envolvendo células tais como células de tumor e/ou células endoteliais que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina. Em uma modalidade, o Domínio Extra B da Fibronectina é expresso em e/ou em torno dos tecidos de tumor tal como na matriz extracelular dos tecidos de tumor e/ou em e/ou nos vasos de tumor tais como neovasos de tumor.

[00196] De acordo com a invenção, a expressão “fração de efector terapêutico” significa qualquer molécula que pode exercer um efeito terapêutico. De acordo com a invenção, uma fração de efector terapêutico é preferivelmente seletivamente guiada para o Domínio Extra B da Fibronectina ou uma célula que é associada ou espacialmente ligada ao Domínio Extra B da Fibronectina. Qualquer agente que exerça um efeito terapêutico em células cancerígenas pode ser usado como o fármaco para conjugação a um agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina. Preferivelmente, a conjugação do fármaco não altera, ou não altera significativamente, as características da ligação, em particular a especificidade, do agente de ligação do Domínio Extra B da Fibronectina, como discutido aqui.

[00197] De acordo com a invenção, uma fração de efector terapêutico inclui agentes anticâncer, radioisótopos tais como compostos marcados com iodo radioativos, toxinas, fármacos citostáticos ou citolíticos, etc. Agentes anticancerígenos compreendem, por exemplo, aminoglutetimida, azatioprina, sulfato de bleomicina, busulfano, carmustina, clorambucila, cisplatina, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabidina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubina, doxorubicina, taxol, etoposida, fluorouracila, interferon- α , lomustina, mercaptopurina, metotrexato, mitotano, procarbazina HCl, tioguanina, sulfato de vinblastina e sulfato de vincristina. Outros agentes anticancerígenos são descritos, por exemplo, em Goodman e Gilman, “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, 8th Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc., em particular Chapter 52 (Antineoplastic Agents (Paul Calabresi e Bruce U.M. Chabner). Toxinas podem ser proteínas tais como proteína

antiviral de *pokeweed*, toxina da cólera, toxina da coqueluche, ricina, gelonina, abrina, exotoxina da difteria ou exotoxina *Pseudomonas*. Resíduos de toxina podem também ser radionuclídeos emissores de alta energia de tal como cobalto-60.

[00198] Frações efetoras terapêuticas incluem, em particular, citosinas ou agentes citotóxicos. Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é detrimental para células e, em particular, extermina as mesmas.

[00199] Classes de agentes citotóxicos úteis incluem, por exemplo, agentes antitubulina, ligantes de cavidade menor de DNA (por exemplo, enedinas e lexitropsinas), inibidores de replicação de DNA, agentes aglutinantes (por exemplo, complexos platina de platina tais como complexos de cis-platina, mono(platina), bis(platina) e platina trinuclear e carboplatina), antraciclina, antibióticos, antifolatos, antimetabólitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etoposidas, pirimidinas fluoradas, ionoforos, nitrosoureas, platinois, compostos de pré-formação, antimetabólitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de radiação, esteróides, taxanos (por exemplo, paclitaxel e docetaxel), inibidores de topoisomerase, vinca alcaloides, ou similares.

[00200] Agente citotóxicos individuais incluem, por exemplo, um androgênio, antramizina (AMC), asparaginase, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, bussulfano, sulfoximina de butionina, camptotecina, carboplatina, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucila, cisplatina, colquiicina, ciclofosfamida, citarabina, citidina arabinósido, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (inicialmente actinomicina), daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, um estrogênio, 5-fluordeoxiuridina, 5-fluorouracila, gramicidina D, hidroxureia, idarubicina, ifosfamida, irinotecano, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalano, 6-mercaptipurina, metotrexato, mitramizina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbizina, estreptozotocina, tenoposido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecano, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 e VM-

26.

[00201] Exemplos de agentes antitubulina incluem, mas sem limitação dolastatinas (por exemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB), maitansinoides, taxanos (por exemplo, paclitaxel, docetaxel), T67 (Tularik), vinca alquiloides (por exemplo, vincristina, vinblastina, vindesina e vinorelbina), derivados de bacatina, análogos de taxano (por exemplo, epotilona A e B), nocodazol, colquicina e colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, combretastatinas, discodermolida, e eleuterobina.

[00202] Radioisótopos para gerar radiofármacos citotóxicos incluem, por exemplo, iodo-131, ítrio-90 ou índio-111.

[00203] Técnicas para conjugar tal fração de efector terapêutico (fármaco) a peptídeos são bem conhecidas. A geração de conjugados peptídeo-fármaco pode ser feita por qualquer técnica conhecida pelos versados na técnica. Um peptídeo e um fármaco podem ser diretamente ligados um ao outro por meio de seus próprios grupos ligantes ou indiretamente por meio de um ligante ou outra substância.

[00204] Inúmeras diferentes reações são disponíveis para ligação covalente de fármacos a peptídeos. Isso é frequentemente feito pela reação dos resíduos de aminoácidos da molécula de peptídeo, incluindo os grupos amina de lisina, os grupos sem ácido carboxílico de ácido glutâmico e aspártico, os grupos sulfidríla de cisteína e as várias frações dos aminoácidos aromáticos. Um dos métodos não específicos mais comumente usados de ligação covalente é a reação de carbodiimida para ligar um grupo carbóxi (ou amino) de um composto aos grupos amino (ou carbóxi) do peptídeo. Adicionalmente, agentes bifuncionais tais como dialdeídos ou imidoésteres foram usados para ligar o grupo amino de um composto aos grupos amino da molécula de peptídeo. Também disponível para ligação de fármacos aos peptídeos é a reação de base de Schiff. Esse método envolve a oxidação de periodato de um fármaco que contém glicol ou grupos hidróxi, dessa forma formando um aldeído que é então reagido com a molécula de peptídeo. A ligação

ocorre por meio de formação de uma base de Schiff com grupos amino da molécula de peptídeo. Isotiocianatos podem também ser usados como agentes de acoplamento para ligar covalentemente fármacos a peptídeos. Outras técnicas são conhecidas pelos versados na técnica e estão dentro do escopo da presente invenção.

[00205] Existem muitos grupos de ligação conhecidos na técnica para produzir conjugados peptídeo-fármaco. Um ligante preferivelmente compreende um ou mais grupos funcionais que reagem com qualquer ou ambos do peptídeo e do fármaco. Exemplos de grupos funcionais incluem grupos amino, carboxila, mercapto, maleimida e piridila.

[00206] Em uma modalidade da invenção, um peptídeo é ligado com um fármaco por meio de um reagente de reticulação bifuncional. Na forma usada aqui, um “reagente de reticulação bifuncional” se refere a um reagente que possui dois grupos reativos, um dos quais é capaz de reagir com um peptídeo, enquanto o outro um é capaz de reagir com o fármaco para ligar o peptídeo com o fármaco, por meio disso formando um conjugado. Qualquer reagente de reticulação bifuncional adequado pode ser usado relativo à invenção, desde que o reagente ligante permita a retenção da citotoxicidade do fármaco, por exemplo, e alvejando características do peptídeo. Preferivelmente, a molécula do ligante une o fármaco ao peptídeo através de ligações químicas, de maneira tal que o fármaco e o peptídeo sejam quimicamente acoplados (por exemplo, covalentemente ligados) um ao outro.

[00207] Em uma modalidade, o reagente de reticulação bifuncional compreende ligantes não cliváveis. Um ligante não clivável é qualquer fração química que é capaz de ligar um fármaco a um peptídeo de uma maneira covalente estável. Preferivelmente, um ligante não clivável não é clivável em condições fisiológicas, em particular, dentro do corpo e/ou dentro de uma célula. Dessa forma, ligantes não cliváveis são substancialmente resistentes a clivagem induzida por ácido, clivagem induzida por luz, clivagem induzida por peptidase, clivagem induzida por esterase, e clivagem por ligação de dissulfeto, em condições nas

quais o fármaco ou o peptídeo permanece ativo. Reagentes de reticulação adequados que formam ligantes não cliváveis entre um fármaco e um peptídeo são bem conhecidos na técnica. Em uma modalidade, o fármaco é ligado ao peptídeo através de uma ligação de tioeter.

[00208] Em uma modalidade particularmente preferida, o reagente de ligação é um ligante clivável. Preferivelmente, um ligante clivável é clivável em condições fisiológicas, em particular dentro do corpo e/ou dentro de uma célula. Exemplos de ligantes cliváveis adequados incluem ligantes de dissulfeto, ligantes lábeis de ácido, ligantes fotolábeis, ligantes lábeis de peptidase, e ligantes lábeis de esterase.

[00209] Exemplos de ligantes incluem, mas sem limitação N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato (SPDB), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC), N-succinimidil-4-(maleimidometil)cicloexano carboxilato (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-cicloexano-1-carbóxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), N-hidroxisuccinimida éster do ácido 4-maleimidobutírico (GMBS), N-hidroxisuccinimida éster do ácido 3-maleimidocapóico (EMCS), m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida ester (MBS), N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida ester (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), N-succinimidil-4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB), N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI), 6-maleimidocaproil (MC), maleimidopropanoil (MP), p-aminobenziloxicarbonil (PAB), N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), e N-succinimidil (4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB). Um ligante de peptídeo tal como valina-citrulina (Val-Cit) ou alanina-fenilalanina (ala-phe) pode também ser usado, e qualquer dos ligantes supramencionados pode ser usado em combinação adequada.

[00210] Ligantes contendo dissulfeto são ligantes cliváveis através de troca de dissulfeto, que pode ocorrer em condições fisiológicas. Em ainda outras modalidades, o ligante é clivável em condições redutoras

(por exemplo, um ligante de dissulfeto). Uma variedade de ligantes de dissulfeto é conhecida na técnica, incluindo, por exemplo, os que podem ser formados usando SATA (N-succinimidil-5-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) e SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno).

[00211] Ligantes lábeis ácidos são ligantes cliváveis em pH ácido. Por exemplo, certos compartimentos intracelulares, tais como endossomas e lisossomas, têm um pH ácido (pH 4-5), e fornecem condições adequadas para clivar ligantes lábeis ácidos. Ligantes lábeis ácidos são relativamente estáveis em condições de pH neutro, tais como os do sangue, mas são instáveis abaixo de pH 5,5 ou 5,0. Por exemplo, um hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-acônica, ortoéster, acetal, cetal, ou similares podem ser usados.

[00212] Fotoligantes lábeis são úteis na superfície do corpo e em muitas cavidades corpóreas que são acessíveis a luz. Além disso, luz infravermelha pode penetrar no tecido.

[00213] Ligantes lábeis de peptidase podem ser usados para clivar certos peptídeos dentro ou fora das células. Em uma modalidade, o ligante clivável é clivado em condições brandas, isto é, condições em uma célula na qual a atividade do agente citotóxico não é afetada.

[00214] O ligante pode ser ou pode compreender, por exemplo, um ligante de peptidila que é clivado por uma enzima peptidase ou protease intracelular, incluindo, mas sem limitação uma protease lisossomal ou endossomal. Tipicamente, o ligante de peptidil tem pelo menos dois aminoácidos de comprimento ou pelo menos três aminoácidos de comprimento. Agentes de clivagem podem incluir catepsinas B e D e plasmina, todos os quais são conhecidos para hidrolisar derivados de fármaco de dipeptídeo resultando na liberação do fármaco ativo nas células alvos. Por exemplo, um ligante de peptidil que é clivável pela protease dependente de tiolcatepsina-B, que é altamente expressa em tecido cancerígeno, pode ser usada (por exemplo, um ligante Phe-Leu ou

um Gly-Phe-Leu-Gly). Em modalidades específicas, o ligante de peptidil clivável por uma protease intracelular é um ligante de valina-citrulina (Val-Cit; vc) ou um ligante de fenilalanina-lisina (Phe-Lys). Uma vantagem de usar liberação proteolítica intracelular do agente terapêutico é que o agente é tipicamente atenuado quando conjugado e as estabilidades de soro dos conjugados são tipicamente altas.

[00215] Os termos “indivíduo” e “sujeito” são usados aqui intercambiavelmente. Eles se referem a seres humanos, primatas não humanos ou outros mamíferos (por exemplo, camundongo, rato, coelho, cachorro, gato, gado, suíno, ovelha, cavalo ou primata) que podem ser afligidos por ou que são suscetíveis a uma doença ou distúrbio (por exemplo, câncer) mas que pode ou não ter a doença ou distúrbio. Em muitas modalidades, o indivíduo é um ser humano. A menos que de outra forma declarado, os termos “indivíduo” e “sujeito” não denotam uma idade particular, e dessa forma engloba adultos, idosos, crianças e recém-nascidos. Em modalidades preferidas da presente invenção, o “indivíduo” ou “sujeito” é um “paciente”. O termo “paciente” significa de acordo com a invenção um sujeito para tratamento, em particular um sujeito doente.

[00216] O termo “doença” se refere a uma condição anormal que afeta o corpo de um indivíduo. Uma doença é frequentemente construída como uma condição médica associada com sintomas e sinais específicos. Uma doença pode ser causada por fatores originalmente de uma fonte externa, tal como uma doença infecciosa, ou pode ser causada por disfunções internas, tais como doenças autoimunes. Em humanos, “doença” é frequentemente usada de forma mais geral para se referir a qualquer condição que causa dor, disfunção, aflição, problemas sociais, ou morte ao indivíduo acometido, ou problemas similares para aqueles em contato com o indivíduo. Nesse sentido mais amplo, algumas vezes inclui lesões, incapacidades, distúrbios, síndromes, infecções, sintomas isolados, comportamentos diferentes, e variações atípicas de estrutura e função, embora em outros contextos e

para outros efeitos essas possam ser consideradas categorias distintas. Doenças normalmente afetam indivíduos não apenas fisicamente, mas também emocionalmente, já que a contrair e viver com muitas doenças pode alterar a expectativa de vida, e a personalidade. De acordo com a invenção, o termo “doença” inclui câncer, em particular as formas de câncer descritas aqui. Qualquer referência aqui a câncer ou forma de câncer particular também inclui metástase de câncer do mesmo. Em uma modalidade preferida, uma doença a ser tratada de acordo com o presente relatório descritivo envolve células que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina.

[00217] “Doenças envolvendo células que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina” ou expressões similares significa de acordo com a invenção que o Domínio Extra B da Fibronectina é expresso por células de um tecido ou órgão doente. Em uma modalidade, a expressão Domínio Extra B da Fibronectina por células de um tecido ou órgão doente é aumentada comparada ao estado em um tecido ou órgão saudável. Em uma modalidade, a expressão é apenas encontrada em um tecido doente, enquanto a expressão em um tecido sadio é reprimida. De acordo com a invenção, doenças envolvendo células que expressam o Domínio Extra B da Fibronectina incluem doenças de câncer. Além disso, de acordo com a invenção, doenças de câncer preferivelmente são aquelas nas quais células expressam Domínio Extra B da Fibronectina.

[00218] As expressões “doença de câncer” ou “câncer” se referem ou descrevem a condição fisiológica em um indivíduo que é tipicamente caracterizada por crescimento celular de desregulado. Exemplos de cânceres incluem, mas sem limitação, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Mais particularmente, exemplos de tais cânceres incluem câncer do osso, câncer do sangue, câncer do pulmão, câncer do fígado, câncer pancreático, câncer de pele, câncer da cabeça e pescoço, melanoma cutâneo ou intraocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer do estômago, câncer de cólon, câncer de mama, câncer de próstata, câncer uterino, carcinoma

dos órgãos sexuais e reprodutivos, doença de Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tireoide, câncer da glândula paratireoide, câncer da glândula adrenal, sarcoma de tecido macio, câncer da bexiga, câncer do rim, carcinoma de célula renal, carcinoma da pélvis renal, neoplasma do sistema nervoso central (CNS), câncer neuroectodérmico, tumores do eixo espinhal, glioma, meningioma, e adenoma da pituitária. O termo “câncer” de acordo com a invenção também compreende metástases de câncer. Preferivelmente, uma “doença de câncer” é caracterizada pela expressão ou presença do Domínio Extra B da Fibronectina.

[00219] Entende-se por “metástase” o espalhamento de células cancerígenas de seu sítio original para uma outra parte do corpo. A formação de metástase é um processo muito complexo e depende da desanexação de células malignas do tumor primário, invasão da matriz extracelular, penetração das membranas basais endoteliais para entrar na cavidade e vasos do corpo, e então, após ser transportada pelo sangue, infiltração de órgãos alvos. Finalmente, o crescimento de um novo tumor no sítio alvo depende de angiogênese. A metástase de tumor frequentemente ocorre mesmo após a remoção do tumor primário em virtude de células ou componentes de tumor poderem permanecer e desenvolver potencial metastático. Em uma modalidade, o termo “metástase” de acordo com a invenção se refere a “metástase distante” que se refere a uma metástase que é remota do tumor primário e do sistema de nó linfático regional. Em uma modalidade, a expressão “metástase” de acordo com a invenção se refere a metástase do linfonodo.

[00220] De acordo com a invenção, o termo “tumor” ou “doença de tumor” se refere a um crescimento anormal de células (denominadas células neoplásticas, células tumorígenas ou células de tumor) preferivelmente formando um inchaço ou lesão. Entende-se por “célula de tumor” uma célula anormal que cresce por uma proliferação celular descontrolada e rápida e continua crescer após o estímulo que inicia o

novo crescimento cessar. Tumores apresentam falta parcial ou completa de organização estrutural e coordenação funcional com o tecido normal, e normalmente formam uma massa distinta de tecido, que pode ser tanto benigno, pré-maligno quanto maligno. De acordo com a invenção, uma “doença de câncer” preferivelmente é uma “doença de tumor”. Entretanto, em geral, os termos “câncer” e “tumor” são usados intercambiavelmente aqui.

[00221] Preferivelmente, uma doença de tumor de acordo com a invenção é uma doença de câncer, isto é, uma doença maligna, e um célula de tumor é uma célula de câncer. Preferivelmente, uma doença de tumor ou doença de câncer é caracterizada pela presença do Domínio Extra B da Fibronectina. Em uma modalidade, um câncer é um câncer do Domínio Extra B da Fibronectina-positivo.

[00222] Um relapso ou recorrência ocorre quando uma pessoa é afetada novamente por uma condição que a afetou no passado. Por exemplo, se um paciente tiver sofrido uma doença de tumor, tiver recebido um tratamento bem sucedido da dita doença e novamente desenvolver a dita doença, a dita doença recém-desenvolvida pode ser considerada relapso ou recorrência. Entretanto, de acordo com a invenção, um relapso ou recorrência de uma doença de tumor pode ocorrer, mas não necessariamente ocorre, no sítio da doença de tumor original. Um relapso ou recorrência de um tumor também inclui situações nas quais um tumor ocorre em um sítio diferente do sítio do tumor original, bem como no sítio do tumor original. Preferivelmente, o tumor original para o qual o paciente recebeu um tratamento é um tumor primário e o tumor em um sítio diferente do sítio do tumor original é um tumor secundário ou metastático.

[00223] A expressão “tratamento” ou “tratamento terapêutico” se refere a qualquer tratamento que melhora o estado de saúde e/ou prolonga (aumenta) o tempo de vida de um indivíduo. O dito tratamento pode eliminar a doença em um indivíduo, impedir ou desacelerar o desenvolvimento de uma doença em um indivíduo, inibir ou desacelerar

o desenvolvimento de uma doença em um indivíduo, diminuir a frequência ou severidade de sintomas em um indivíduo, e/ou diminuir a recorrência em um indivíduo que atualmente tem ou que previamente teve uma doença.

[00224] As expressões “tratamento profilático” ou “tratamento preventivo” se referem a qualquer tratamento que é destinado a impedir que uma doença ocorra em um indivíduo. As expressões “tratamento profilático” ou “tratamento preventivo” são usadas aqui intercambiavelmente. Por exemplo, um sujeito em risco de câncer seria um candidato a terapia para impedir o câncer.

[00225] Entende-se por “estando em risco” um sujeito que é identificado com uma chance acima do normal de desenvolver uma doença, em particular câncer, comparado à população geral. Além do mais, um sujeito que teve, ou que tem atualmente, uma doença, em particular câncer, é um sujeito que tem um risco aumentado de desenvolver uma doença, já que tal sujeito pode continuar a desenvolver uma doença. Sujeitos que atualmente têm, ou que tiveram, um câncer também têm um risco aumentado de metástases de câncer.

[00226] Um tratamento de câncer (terapêutico) pode ser selecionado do grupo que consiste em cirurgia, quimioterapia, terapia de radiação e terapia direcionada.

[00227] O termo “cirurgia”, na forma usada aqui, inclui a remoção de tumores em uma operação. Ela é um tratamento comum para câncer. Um cirurgião pode remover os tumores usando excisão local.

[00228] O termo “quimioterapia”, na forma usada aqui, se refere ao uso de agentes quimioterapêuticos ou combinações de agentes quimioterapêuticos, preferivelmente para parar o crescimento de células cancerígenas, tanto pela exterminação das células quanto fazendo com que elas parem de se dividir. Quando quimioterapia é administrada pela boca ou injetada em uma veia ou músculo, os fármacos entram na corrente sanguínea e podem chegar às células cancerígenas através do corpo (quimioterapia sistêmica). Quando quimioterapia é colocada

diretamente no fluido cerebrospinal, um órgão, ou uma cavidade corpórea tal como o abdômen, os fármacos basicamente afetam as células cancerígenas nessas áreas (quimioterapia regional).

[00229] Agentes quimioterapêuticos de acordo com a invenção incluem compostos citostáticos e compostos citotóxicos. Agentes quimioterapêuticos tradicionais atuam exterminando células que dividem rapidamente, uma das principais propriedades da maioria das células cancerígenas. Isso significa que quimioterapia também causa dano nas células que dividem rapidamente em circunstâncias normais tais como as células na medula óssea, trato digestivo, e folículos capilares. Isso resulta nos efeitos colaterais mais comuns de quimioterapia. Agentes que alvejam proteínas que são anormalmente expressos em um câncer (tal como o Domínio Extra B da Fibronectina) e atuam através de uma fração ou agente terapêutico conjugado ao agente podem ser vistos como uma forma de quimioterapia. Entretanto, no sentido restrito, a expressão “quimioterapia” de acordo com a invenção não inclui terapia direcionada.

[00230] De acordo com a invenção, a expressão “terapia direcionada” se refere a qualquer terapia que pode ser usada para alvejar preferencialmente órgãos, tecidos ou células doentes, tais como tecidos ou células com câncer, enquanto órgãos, tecidos ou células não doentes não são alvejados, ou alvejados a uma menor extensão. Alvejamento de órgãos, tecidos ou células doentes preferivelmente resulta em extermínio e/ou impedimento de proliferação ou viabilidade de células doentes. Tal terapia inclui i) agentes que são conjugados a uma fração terapêutica que alveja certos alvos, por exemplo, Domínio Extra B da Fibronectina, para administrar a fração terapêutica (por exemplo, Agentes de ligação de Domínio Extra B da Fibronectina conjugado a uma fração terapêutica) ou ii) agentes que alvejam certos alvos, por exemplo, Domínio Extra B da Fibronectina, e prejudicam a proliferação, espalhamento, migração e/ou viabilidade de células doentes, (por exemplo, agentes de ligação de Domínio Extra B da

Fibronectina conjugados a uma fração terapêutica ou não conjugados a uma fração terapêutica).

[00231] As composições farmacêuticas e métodos de tratamento descritos de acordo com a invenção podem ser usados para terapêuticamente tratar ou impedir uma doença descrita aqui. É possível usar modelos animais para testar um efeito no câncer. Por exemplo, células cancerígenas de humano podem ser introduzidas em um camundongo para gerar um tumor. O efeito nas células cancerígenas (por exemplo, redução no tamanho do tumor) pode ser medido como uma medida para a eficácia de um agente administrado ao animal.

[00232] Peptídeos podem ser administrados de uma maneira conhecida per se. Em geral, doses de um peptídeo de 1 ng a 1 mg, preferivelmente de 10 ng a 100 µg, são formuladas e administradas.

[00233] Se a administração de ácidos nucleicos (DNA e RNA) for desejada, doses de 1 ng a 0,1 mg podem ser formuladas e administradas.

[00234] Em uma modalidade, ácidos nucleicos são administrados por métodos *ex vivo*, isto é, pela remoção de células de um paciente, modificação genética das ditas células a fim de incorporar um ácido nucleico e reintrodução das células alteradas no paciente. Isso em geral compreende introduzir uma cópia funcional de um gene nas células de um paciente *in vitro* e reintroduzir as células geneticamente alteradas no paciente. A cópia funcional do gene é sob o controle funcional de elementos regulatórios que permitem que o gene seja expresso nas células geneticamente alteradas. Os métodos de transfecção e transdução são conhecidos pelos versados na técnica.

[00235] A invenção também permite a administração de ácidos nucleicos *in vivo* usando, por exemplo, vetores tais como vírus e lipossomas controlados para o alvo.

[00236] Em uma modalidade preferida, um vírus ou vetor viral para administração de um ácido nucleico é selecionado do grupo que

consiste em adenovírus, vírus adenoassociado, pox vírus, incluindo vírus de vacina e pox vírus atenuado, vírus Semliki Forest, retrovírus, vírus Sindbis e partículas Ty tipo vírus. Preferência particular é dada a adenovírus e retrovírus. Os retrovírus são tipicamente deficientes em replicação (isto é, eles são incapazes de gerar partículas infecciosas).

[00237] Métodos para introdução de ácidos nucléicos em células *in vitro* ou *in vivo* compreendem transfecção de precipitados de fosfato de cálcio de ácido nucléico, transfecção de ácidos nucléicos associados com DEAE, transfecção ou infecção com os vírus citados que carregam os ácidos nucléicos de interesse, transfecção mediada por lipossoma, e similares. Em modalidades particulares, preferência é dada ao direcionamento do ácido nucléico para células particulares. Em tais modalidades, um transportador usado para administrar um ácido nucléico a uma célula (por exemplo, um retrovírus ou um lipossoma) pode ter uma molécula controle ligada ao alvo. Por exemplo, uma molécula tal como um anticorpo específico para uma proteína de membrana de superfície na célula alvo ou um ligante para um receptor na célula alvo pode ser incorporado ou ligado ao ácido nucléico transportador. Anticorpos preferidos compreendem anticorpos que se ligam seletivamente a um antígeno de tumor. Se a administração de um ácido nucléico por meio de lipossomas for desejada, proteínas que se ligam a uma proteína de membrana de superfície associada com endocitose podem ser incorporadas na formulação de lipossoma a fim de tornar o controle e/ou captação do alvo possível. Tais proteínas compreendem proteínas de capsídeos ou fragmentos das mesmas que são específicos para um tipo de célula particular, anticorpos para proteínas que são internalizadas, proteínas que abordam um sítio intracelular, e similares.

[00238] Os compostos terapeuticamente ativos da invenção podem ser administrados por meio de qualquer via convencional, incluindo por injeção ou infusão. A administração pode ser realizada, por exemplo, oralmente, intravenosamente, intraperitonealmente,

intramuscularmente, subcutaneamente ou transdermicamente. A administração pode ser localmente ou sistemicamente, preferivelmente sistemicamente.

[00239] A expressão “administração sistêmica” se refere à administração de um agente de maneira tal que o agente fique amplamente distribuído no corpo de um indivíduo em quantidades significantes e desenvolva um efeito desejado. Por exemplo, o agente pode desenvolver seu efeito desejado no sangue e/ou atingir seu sítio desejado de ação por meio do sistema vascular. Vias de administração sistêmicas típicas incluem administração pela introdução do agente diretamente no sistema vascular ou administração oral, pulmonar, ou intramuscular em que o agente é adsorvido, entra no sistema vascular, e é carregado para um ou mais sítio(s) de ação desejado(s) por meio do sangue.

[00240] De acordo com a presente invenção, é preferido que a administração sistêmica seja por administração parenteral. A expressão “administração parenteral” se refere a administração de um agente de maneira tal que o agente não passe para o intestino. A expressão “administração parenteral” inclui administração intravenosa, administração subcutânea, administração intradérmica ou administração intra-arterial, mas não é limitada a isso.

[00241] As composições farmacêuticas da invenção são preferivelmente estéreis e contêm uma quantidade eficaz dos agentes descritos aqui e opcionalmente de agentes adicionais como discutido aqui para gerar a reação desejada ou o efeito desejado.

[00242] Composições farmacêuticas são normalmente providas em uma forma de dosagem uniforme e podem ser preparadas de uma maneira conhecida per se. Uma composição farmacêutica pode, por exemplo, ser na forma de uma solução ou suspensão.

[00243] Uma composição farmacêutica pode compreender sais, substâncias tampões, conservantes, transportadores, diluentes e/ou excipientes, todos os quais são preferivelmente farmacêuticamente

aceitáveis. A expressão “farmaceuticamente aceitáveis” se refere a não toxicidade de um material que não interage com a ação do componente ativo da composição farmacêutica.

[00244] Sais que não são farmaceuticamente aceitáveis podem ser usados para preparar sais farmaceuticamente aceitáveis e são incluídos na invenção. Sais farmaceuticamente aceitáveis desse tipo compreendem de uma maneira não limitante os preparados a partir dos seguintes ácidos: ácido clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malônico, succínico e similares. Sais farmaceuticamente aceitáveis podem também ser preparados como sais de metal alcalino ou sais de metal alcalino terroso, tais como sais de sódio, sais de potássio ou sais de cálcio.

[00245] Substâncias tampões adequadas para uso em uma composição farmacêutica incluem ácido acético em um sal, ácido cítrico em um sal, ácido bórico em um sal e ácido fosfórico em um sal.

[00246] Conservantes adequados para uso em uma composição farmacêutica incluem cloreto de benzalcônio, clorobutanol, parabeno e timerosal.

[00247] O termo “transportador” se refere a um componente orgânico ou inorgânico de uma natureza natural ou sintética, no qual o componente ativo é combinado a fim de facilitar, intensificar ou habilitar a aplicação. De acordo com a invenção, o termo “transportador” também inclui uma ou mais cargas sólidas ou líquidas, diluentes ou substâncias encapsulantes compatíveis, que são adequados para administração a um paciente.

[00248] Possíveis substâncias transportadoras para administração parenteral são, por exemplo, água estéril, Ringer, lactato de Ringer, solução de cloreto de sódio estéril, polialquileno glicóis, naftalenos hidrogenados e, em particular, polímeros de lactídeo biocompatíveis, copolímeros de lactídeo/glicolídeo ou copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.

[00249] Uma formulação injetável pode compreender um excipiente farmacologicamente aceitável tal como Lactato de Ringer.

[00250] O termo “excipiente” quando usado aqui é para indicar todas as substâncias que podem estar presentes em uma composição farmacêutica e que não são ingredientes ativos tais como, por exemplo, transportadores, aglutinantes, lubrificantes, espessantes, agentes de superfície ativa, conservantes, emulsificantes, tampões, agentes flavorizantes, ou corantes.

[00251] Os agentes e composições descritos aqui são administrados em quantidades eficazes. Uma “quantidade eficaz” se refere à quantidade que alcança uma reação desejada ou um efeito desejado sozinho ou junto com outras doses. No caso de tratamento de uma doença particular ou de uma condição particular, a reação desejada preferivelmente se refere a inibição do curso da doença. Isso compreende desacelerar o progresso da doença e, em particular, interromper ou reverter o progresso da doença. A reação desejada em um tratamento de uma doença ou de uma condição pode também ser atrasada do início de ação ou uma prevenção do início de ação da dita doença ou da dita condição.

[00252] Uma quantidade eficaz de um agente ou composição descrita aqui dependerá da condição a ser tratada, da severidade da doença, dos parâmetros individuais do paciente, incluindo idade, condição fisiológica, tamanho e peso, da duração do tratamento, do tipo de uma terapia de acompanhamento (se presente), da via de administração específica e fatores similares. Dessa forma, as doses administradas dos agentes descritos aqui podem depender de vários de tais parâmetros. No caso em que uma reação em um paciente é insuficiente com uma dose inicial, doses mais altas (ou doses efetivamente mais altas alcançadas por uma via de administração diferente, mais localizada) podem ser usadas.

[00253] Os agentes e composições descritos aqui podem ser administrados a pacientes, por exemplo, *in vivo*, para tratar ou prevenir

uma variedade de distúrbios tais como os aqui descritos. Pacientes preferidos incluem pacientes humanos com distúrbios que podem ser correlacionados ou atenuados pela administração dos agentes e composições descritos aqui. Isso inclui distúrbios caracterizados por um padrão de expressão alterado do Domínio Extra B da Fibronectina.

[00254] Por exemplo, em uma modalidade, os agentes descritos aqui podem ser usados para tratar um paciente com uma doença de câncer, por exemplo, uma doença de câncer tal como descrito aqui caracterizada pela presença do Domínio Extra B da Fibronectina.

[00255] A presente invenção é descrita em detalhe pelas figuras e exemplos seguintes, que são usadas apenas para efeitos de ilustração e não visam ser limitantes. Por causa da descrição e dos exemplos, modalidades adicionais que são similarmente incluídas na invenção são acessíveis aos versados na técnica.

FIGURAS

[00256] A **FIG. 1: A:** SDS-PAGE analítica de proteínas FN após purificação IMAC e SEC. Um total de 10 µg de proteína foi aplicado a SDS-PAGE em condições redutoras (+β-mercaptoetanol) e não redutoras (-β-mercaptoetanol). A pureza do lote de proteína foi além disso determinada por meio de análise densitométrica usando software ImageQuant da imagem SDS-PAGE não modificado. Contraste e brilho foram alterados nessa imagem para melhor visualização. **B:** análise de ligação baseado em ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) de FN-6789, FN-67B89 e FN-B com anticorpo anti-His- e BC-1. As barras de erro representam desvios padrões resultantes de medições em duplicata, com 1 µg de proteínas revestido por poço, respectivamente.

[00257] A **FIG. 2:** Minisequências de proteína nó de cistina enriquecidas após três etapas de classificação de fago de bibliotecas MCopt 1.0 e MCopt 2.0. Nome do clone, minisequência de proteína nó de cistina e proporção de clones de classificação total são representados para cada candidato. Aminoácidos variáveis são mostrados em letras

em negrito. O motivo R-I/V-R(L) comum identificado é salientado em cinza.

[00258] A **FIG. 3:** Miniproteínas nó de cistina de ligação a EDB resultantes da classificação de exibição de fato da biblioteca MCopt 1.0 e após o processo de identificação de acerto. Valores de classificação foram calculados com base nas razões sinal (FN-B) para ruído (BSA) determinadas por meio de ELISA e foram adicionalmente normalizados na taxa de expressão de Trx-miniproteínas nó de cistina. Aminoácidos variáveis são mostrados em letras em negrito.

[00259] A **FIG. 4:** Análise de especificidade clones de Trx-miniproteína nó de cistina MCopt 1.0-1/-2/-3 e MCopt 2.0-1/-2/-3. 200 nM de cada variante foi aplicada a proteínas alvos FN-B e FN-67B89 imobilizadas bem como a proteínas controle FN-6789, leite em pó e albumina sérica bovina (revestido a 1 µg/poço). Um anticorpo anti-s-tag HRP-conjugado foi usado para analisar a ligação. ELISA foi realizada em duplicatas com Trx-MC-Myc-010 servindo como controle negativo.

[00260] A **FIG. 5:** Análise de especificidade estendida de clones de Trx-miniproteína nó de cistina MCopt 1.0-2/-3 e MCopt 2.0-1/-2/3. No total 200 nM de cada variante foram aplicados a proteínas alvos FN-B, T7-TEV-B, FN-67B89 e FN-B(8-14) bem como a controles negativos FN-6789, leite em pó, albumina sérica bovina, lisozima, ovalbumina e aldolase (revestido a 1 µg/poço). ELISA foi realizada em duplicatas, barras de erro representam desvio padrão e Trx-MC-Myc-010 serviu como controle negativo de miniproteína nó de cistina.

[00261] A **FIG. 6:** Curvas de saturação-ligação de ligação de MCopt 1.0-2/-3 e MCopt 2.0-1/-2/-3 EDB. Ligação de Trx-miniproteína nó de cistina foi ensaiada contra alvos de FN-B, FN-67B89 e FN-B(8-14) bem como contra proteína de controle FN-6789 (revestida a 1 µg/poço) em dez diferentes concentrações. Ligação de Trx-miniproteínas nó de cistina foi detectada com um anticorpo anti-s-tag HRP-conjugado. ELISAs foram realizados em duplicatas (valores simples para FN-B(8-

14)).

[00262] A **FIG. 7: A:** Respectivos aminoácidos na primeira, segunda ou quinta sequência MC-FN-010 da alça de parental foram trocados com alanina. Substituições de alanina são salientadas em cinza. **B:** MC-FN-010 parental variante de varreduras de alanina como Trx-proteínas de fusão (50 nM a 1,563 nM) foram incubadas com FN-B humano pre-revestida. A ligação foi detectada com 10 ng de HRP-anticorpo anti-s-tag-conjugado. ELISA foi realizada em duplicatas e em três ensaios independentes. Ligação relativa de cada variante foi calculada pela determinação das constantes de ligação aparentes e comparação a MC-FN-010 parental. Barras de erro representam o desvio padrão de três medições em duplicata. **C:** Sequência de MC-FN-010 parental. Letras em negrito e colchetes indicam a cisteína de aminoácido e a conectividade da ligação de dissulfeto. Resíduos salientados em cinza claro são relevantes para alvo-ligação, os que são marcados em cinza não contribuem na interação de ligação, ou apenas até um valor menor.

[00263] A **FIG. 8:** Ligação específica de MC-FN-010 a seções de tumor de enxerto de glioblastoma. Resultados representativos de manchamento de imunofluorescência de tecidos de tumor U-87 MG com ligante EDB MC-FN-010 e controle negativo MC-FN-0115. As seções de tecido (5 μ m) foram manchadas com complexo cistina-miniproteína nó de cistina-biotina estreptavidina-Cy3 tetramerizado (vermelho) e com um anticorpo anti-CD31 para visualizar a vasculatura (verde). Barras de escala indicam 100 μ m.

[00264] A **FIG. 9: A:** Análise de especificidade de Trx-MC-FN-010 para FN-67B89 humano e FN-6789 usando ELISA. **B:** Análise de especificidade de Trx-MC-FN-016 para FN-67B89 e FN-6789 humano usando ELISA. Ligação de Trx-MC-FN-010 e Trx-MC-FN-016 a FN-67B89 com concentrações variando de 1,56-50 nM em comparação com FN-6789 foi detectada com 50 ng de anticorpo anti-s-tag HRP-conjugado. ELISA foi realizada em duplicatas usando 1 μ g FN-67B89 ou FN-6789 revestido por poço.

[00265] A **FIG. 10: A:** Parâmetros cinéticos de MC-FN-010 e MC-FN-016 resultantes da análise de ressonância plasmônica de superfície. FN-67B89 humano biotilado foi imobilizado no sensor de estreptavidina para realizar determinação de afinidade de MC-FN-010 e MC-FN-016 usando diluições seriais duas vezes começando de 4000 nM. Parâmetros cinéticos foram calculados usando um modelo de ajuste 1:1 Langmuir aplicado aos sensorgramas gerados. **B:** Parâmetros cinéticos de AF680-(MC-FN-010)₃ e AF680-(MC-FN-016)₃ resultantes de ressonância plasmônica de superfície com análise cinética de um único ciclo. FN-67B89 humano biotilado foi imobilizado em chip de estreptavidina para realizar determinação de ligação de AF680-(MC-FN-010)₃ e AF680-(MC-FN-016)₃ usando diluição serial de duas vezes começando 10 nM. Parâmetros cinéticos foram calculados usando um modelo de ajuste 1:1 Langmuir aplicado a sensorgramas gerados.

[00266] A **FIG. 11: A:** Imagem *in vivo* e *ex vivo* de camundongos portadores de U-87 MG. Camundongos com tumores que surgem de células U-87 MG de humano injetadas s.c. foram imageados após aplicação i.v. de 3,36 nmol AF680-(MC-FN-010)₃, AF680-(MC-FN-016)₃ (EDB aglutinante) e controle AF680-(MC-FN-0115)₃. Grupos foram estratificados com três camundongos por grupo, cada um carregando um tamanho de tumor diferente. Formação de imagem foi realizada 1 h, 2 h e 6 h pós injeção. Após imageamento *in vivo* os órgãos e tumores foram excisados, pesados e usados para análise de sinal de fluorescência *ex vivo*. **B:** Desenvolvimento de sinais de fluorescência com o tempo em tumor, rim, fígado e pulmão. Sinais de fluorescência de órgãos foram quantificados usando software de análise de imagem *Living Image* 2.5 e normalizados no respectivo peso de órgão/tumor. Médias de conjuntos de dados são mostradas resultantes de triplicatas ± SE. Significância estatística foi calculada com ANOVA a duas variáveis (*P < 0,0342; **P < 0,0055; ***P = 0,0001; ****P < 0,0001; n. s. = não significante).

[00267] A **FIG. 12:** Manchamento de imunofluorescência

representativo de cérebro de camundongo normal com ligante EDB MC-FN-010 e controle negativo MC-FN-0115. Seções de tecido (6 μm) foram manchadas com complexo miniproteína nó de cistina-biotina / estreptavidina-Cy3 tetramerizado e um anticorpo anti-CD31 para visualizar a vasculatura. Barras de escala, 100 μm .

[00268] A **FIG. 13: Ligação específica de MC-FN-010 a seções de tecido derivadas da linha celular de humano de glioblastoma MG U-87 crescido como tumor de enxerto de camundongo.** Manchamento de imunofluorescência representativo de tecidos de tumor MG U-87 **(A)** e cérebro de camundongo normal **(B)** com MC-FN-010 trimérico e controle negativo MC-FN-0115. Seções de tecido (6 μm) foram manchadas com conjugado trimérico de miniproteínas nó de cistina Alexa Flúor 680 e um anticorpo anti-CD31 detectado com um anticorpo secundário para visualizar a vasculatura. Barras de escala, 20 μm .

[00269] A **FIG. 14: A:** Imagem *in vivo* de camundongos portadores de MG U-87. Tumores derivados de células MG U-87 de humano injetadas s.c. em flancos de camundongos Fox n1/nu foram submetidas a imageamento após aplicação i.v. de 3,34 nmol AF680-(MC-FN-016)₃ sozinho, ou em combinação com um excesso molar 3 e 5 vezes de DOTA-(MC-FN-016)₃ injetado simultaneamente (co-injeção) ou 30 min antes dele (pré-injeção). Peptídeo alanina-mutante triplo AF680-(MC-FN-0115)₃ serviu como um controle negativo. **B:** Imagem de órgãos 6 h após injeção i.v. das sondas. **C:** Sinais de fluorescência em tumores foram quantificados e normalizados no respectivo peso de tumor.

[00270] A **FIG. 15: Análise de ligação de SPR de variantes de miniproteína nó de cistina a EDB.** Parâmetros cinéticos de variantes de miniproteína nó de cistina EDB-específico medidos por análise de ressonância plasmônica de superfície e calculada usando um modelo de ajuste 1:1 Langmuir. FN-67B89 de humano biotilado foi imobilizado em um sensor de estreptavidina para determinar afinidade de DOTA-(MC-FN-016)₃ usando diluições seriais duas vezes.

EXEMPLOS

[00271] As técnicas e métodos usados aqui são descritos aqui ou realizados de uma maneira conhecida per se e como descrito, por exemplo, em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Todos os métodos incluindo o uso de kits e reagentes são realizados de acordo com a informação do fabricante, a menos que especificamente indicado.

Exemplo 1: Material e Métodos

Expressão, purificação e biotinizilação direcionada

[00272] Fibronectina EDB humana recombinante tanto como um único domínio (FN-B, Uniprot ID P02751, isoforma 7, aminoácido E1265-T1355) quanto flanqueada por seu domínio circundante tipo IIIs (FN-67B89, aminoácido G1080-E1455) serviu como proteína alvo nesse estudo enquanto os domínios 6-9 sem EDB (FN-6789) foram usados como controle. Todas as variantes foram expressas em *E. coli* com uma *tag* de hexaistidina C-terminal (H6) e purificadas por meio de cromatografia de afinidade iônica imobilizada com metal (IMAC) e cromatografia de exclusão de tamanho (SEC). Para isso, sequências de DNA códon otimizadas foram sintetizadas por Thermo Fisher Scientific, clonadas em vetor de expressão pET-21a (Novagen) e introduzidas em células BL21 *E. coli* (DE3) (Agilent). Proteínas foram expressas em uma escala 750-mL a 30 °C, 120 rpm até um OD₆₀₀ de aproximadamente 0,7 ser atingido. Para indução de produção de proteína, 750 µL 1 M IPTG foram adicionados à cultura principal e incubados a 25 °C, 120 rpm por toda a noite. As células foram colhidas, ressuspensas em 10 mL tampão de equilíbrio (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 % glicerol, 500 mM NaCl, 10 mM imidazolo) e lisadas por sonificação (Branson Digital Sonifier 250). O sobrenadante foi purificado por IMAC com uma coluna HisTrap 1 mL (GE Healthcare) usando um sistema ÄKTApriTM plus (GE Healthcare)

e um gradiente linear de 10-500 mM imidazolo em 20 min. Subsequentemente, proteínas foram dialisadas contra PBS (14 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,5) a 4 °C por toda a noite e adicionalmente purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho usando um HiLoad 26/600 Superdex 200 pg (para FN-67B89 e FN-6789) ou coluna 75 pg (para FN-B) (GE Healthcare). Proteínas purificadas finais foram analisadas por meio de SDS-PAGE, SEC analítico e por meio de ELISA usando o anticorpo BC-1 EDB específico (ab154210, Abcam). Proteínas foram armazenadas em alíquotas em PBS suplementado com 5 % manitol e 5 % trealose a -20 °C.

[00273] Proteínas FN-B, FN-67B89 e FN-6789 foram biotinizadas por meio de grupos NH₂-primários usando EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific) de acordo com introduções do fabricante.

Controle de Qualidade de proteína alvo FN-67B89

[00274] Para determinar a qualidade de proteína FN-67B89 expressa e purificada, ELISA foi usada como técnica para analisar interações proteína-proteína em um formato de 96-poços. Em uma primeira etapa, 10 µg/mL de proteínas alvos foram revestidos em uma placa de 96 poços Maxisorb™ em um volume de 100 µL por meio de absorção passiva em condições alcalinas, usando 50 mM Na₂CO₃ pH 9,4 tampão de revestimento. Revestimento de placas de ELISA foi realizado por toda a noite a 4 °C. Após a remoção do tampão de revestimento as placas foram lavadas três vezes com 300 µL PBS-T e 300 µL de tampão de bloqueio (3 % BSA em PBS) foram adicionados. O bloqueio foi realizado por 2 h a RT. Para incubação primária, as placas foram lavadas três vezes com 300 µL PBS-T e incubadas por 1 h com 100 µL de anticorpo BC-1 diluído 1:1000 em PBS-T, a 4 °C. Um anticorpo anti-camundongo HRP-conjugado (554002, BD Pharmingen™) diluído 1:5000 em PBS foi adicionado após lavagem três

vezes com PBS-T em 100 μ L /poço e incubado para 1 h a 4 °C. As placas foram então lavadas três vezes com PBS-T e três vezes com PBS antes da detecção de complexos antígeno-anticorpo por meio de Conversão medida por HRP de substrato TMB. 100 μ L de substrato TMB foram adicionados aos poços e uma cor azul revelada em proporção à quantidade de analito presente na amostra. A revelação da cor foi interrompida pela adição de 50 μ L 0.2 M HCl e a absorbância específica foi medida a 450 nm.

Seleção de ligantes EDB-específico por meio de exibição de fago

[00275] Miniproteínas nó de cistina EDB-específico foram selecionadas por meio de exibição de fago usando duas diferentes bibliotecas combinatoriais que são baseadas em uma variante de cadeia aberta do inibidor de tripsina II de *Momordica cochinchinensis* (oMCoTI-II). Ambas as bibliotecas são baseadas em um sistema de fagemídeo M13, mas diferem com relação ao esquema de randomização aplicado. Embora na biblioteca MCopt1.0 a alça um (incluindo uma variação de comprimento de 6, 9 e 12 aminoácidos) e três bem como dois aminoácidos no N-término tenha sido randomizada, a biblioteca MCopt2.0 foi construída por meio de randomização da alça 1 com 10 aminoácidos apenas. Adicionalmente, eles são também diferentes no tipo de exibição já que MCopt1.0 está apresentado por meio de proteína de revestimento principal pVIII e MCopt2.0 por meio de pIII.

[00276] No total três rodadas de seleção baseadas em microesferas magnéticas revestidas com estreptavidina (SA) foram realizadas com cada biblioteca. Para uma rodada de classificação 2 x 50 μ L Dynamicmicroesferas® M-280 Estreptavidina (Life Technologies) foram transferidas para um tubo 2 mL cada uma e lavadas com 1 mL TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20, pH 7,4). 100 μ g de FN-B biotinizada em 200 μ L TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) foram adicionados ao primeiro tubo, 200 μ L TBS sem alvo ao segundo tubo (seleção negativa de fagos) e microesferas foram incubadas no

misturador de rolamento por 20 min a 30 rpm. Os tubos foram colocados de volta no ímã, a solução restante foi descartada e as microesferas lavadas duas vezes com TBS-T. As microesferas foram bloqueadas com 2 % de leite em pó (Carl Roth) em TBS por 1 h a 4 °C e 30 rpm. Enquanto microesferas AS revestidas com FN-B biotiniladas foram bloqueadas por outros 30 min, 7×10^{13} (primeira rodada) ou 7×10^{12} (segunda e terceira rodada) fagos foram adicionados às microesferas SA não revestidas em 1 mL 2 % de leite em pó em TBS e incubadas por 30 min a RT, 30 rpm (seleção negativa). A solução de bloqueio de microesferas alvo-revestidas foi descartada; microesferas lavadas duas vezes com TBS-T e sobrenadante fago na seleção negativa foi adicionado. Microesferas alvo-revestidas foram incubadas com a suspensão de fago por 1 h a RT e 30 rpm. Subsequentemente, fagos não ligados foram removidos por lavação, lavando as microesferas seis vezes com TBS-T e duas vezes com TBS. Para eluir fagos ligados, uma eluição com deslocamento de pH foi realizada, adicionando 50 µL 100 mM trimetilamina (TEA) às microesferas lavadas. A suspensão de microesfera TEA foi incubada por 6 min a 3000 rpm, colocada de volta no ímã e o sobrenadante transferido para um tubo fresco contendo 100 µL 1M Tris/HCl pH 7 para neutralização. Uma segunda etapa de eluição foi realizada adicionando 50 µL de 100 mM glicina (pH 2) às microesferas alvo-revestidas e incubando a mistura por 10 min em um termomisturador a max rpm. Os tubos foram colocados de volta no ímã e o sobrenadante foi transferido para a mistura Tris/TEA da primeira eluição. O eluato fago foi usado para infectar XL1-Blue *E. coli* que cresce exponencialmente (Agilent) para amplificação de agrupamento de fago. 1800 µL células XL1-Blue de *E. coli* a um OD₆₀₀ de 0,5 foram adicionadas ao eluato e incubadas por 30 min a 37 °C sem agitação e por 30 min a 37 °C com agitação a 150 rpm. As células XL1-Blue infectadas foram então dispendidas em duas placas de ágar grandes contendo 100 µg/mL carbenicilina e 0,4 % glicose e incubadas por toda a noite a 37 °C, antes de o resgate de fago ser realizado no dia seguinte.

[00277] Para resgate de fago 4 mL LB os meios foram distribuídos por placa e células raspadas com um raspador de célula. Uma cultura de 50-mL foi inoculada em um OD₆₀₀ final de 0,2. Células foram crescidas até um OD₆₀₀ de 0,5 e infectadas com $0,5 \times 10^{12}$ fagos auxiliares VCSM13 (Agilent) para produção de fago a partir de vetor de fagemídeo. Células XL1-Blue de *E. coli* foram incubadas por 30 min, 37 °C, sem agitação seguida por 30 min, 37 °C, com agitação a 150 rpm. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 4.500 x g por 10 min a RT e o sobrenadante descartado. Precipitados bacterianos foram coletados em 50 mL de meio LB (suplementado com 100 µg/mL carbenicilina, 25 µg/mL canamicina, 1 mM IPTG) para indução de produção de proteína e culturas de produção de fago de *E. coli* crescidas por toda a noite a 30 °C, 250 rpm. Células *E. coli* foram colhidas por centrifugação a 4.500 x g por 15 min, 4 °C. 10 mL de solução PEG/NaCl (25 % (p/v) polietileno glicol, 15 % (p/v) NaCl) foram adicionados a 40 mL do sobrenadante contendo fago, invertidos e colocados em gel por 30 min. Partículas de fago foram precipitadas por meio de centrifugação a 15.000 x g, 20 min a 4 °C. Sobrenadantes foram descartados e precipitados de fago foram coletados em 1.600 µL Tris/HCl (pH 8,0) para subsequente centrifugação a 15.000 x g, 10 min a 4 °C. O sobrenadante contendo fago foi adicionado a 400 µL PEG/NaCl novamente e incubado em gelo por 20 min. Após precipitação do segundo PEG/NaCl, os tubos foram centrifugados a 15.000 x g, 15 min a 4 °C. Precipitados de fago foram ressuspensos em 800 µL Tris/HCl e aquecidos a 65 °C, 15 min em uma etapa de purificação final. Suspensões de fago foram centrifugadas a RT, 15.000 x g por 10 min, sobrenadantes foram coletados e concentração de partícula de fago foi determinada fotometricamente usando o modo de comprimento de onda duplo OD₂₆₉-OD₃₂₀. Concentrações de fago foram calculadas de acordo com o teor de nucleotídeo e coeficiente de extinção molar de fagos M13 (Barbas *et al.* 2004).

Identificação de acerto de miniproteínas nó de cistina selecionadas

[00278] No processo de identificação, fagemídeos do agrupamento de classificação enriquecido derivados da 3ª rodada de classificação foram preparados a fim de amplificar as minissequências de proteína nó de cistina por PCR. Insetos de PCR foram clonados no vetor de expressão pET-32-LibEx, um derivado de pET-32a (Novagen), para permitir uma expressão de miniproteínas nó de cistina como variantes de fusão de tiorredoxina-A. Esse vetor carrega sequências de DNA em ordem sucessiva que codifica para tiorredoxina-A de *E. coli* para permitir ligação eficiente de formação de dissulfeto no citoplasma, um H6-tag para rápida purificação, uma s-tag para detecção por um anticorpo e um sítio de clivagem de trombina para remover a etiqueta de fusão. Fragmentos DNA que codificam para minissequências de proteína nó de cistina foram introduzidos à jusante do sítio de clivagem de trombina no vetor pET-32-LibEx por meio de sítios de restrição *Bam* HI e *Kpn* I exclusivos. Vetores foram introduzidos em células de expressão SHuffle® T7 de *E. coli* (New England BioLabs) por meio de choque térmico e as células foram plaqueadas em placas de ágar seletivas. Colônias simples foram coletadas, sequenciadas e transferidas para uma placa de 96 poços para expressão em pequena escala em 1 mL de meio de autoindução (MagicMedia™, Thermo Fisher Scientific). A produção de proteína foi conduzida a 30 °C e 220 rpm por toda a noite. Células foram colhidas por centrifugação a 3000 x g por 15 min, lisadas por meio de incubação em tampão (20 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, pH 8) contendo 0,1 mg/mL de lisozima (Merck Millipore) e 5 U/mL de benzonase (Merck Millipore) combinados com um ciclo de congelamento-descongelamento e aquecidos por 10 min a 80 °C. Após uma centrifugação final (3000 x g, 15 min, 4 °C) para remover resíduos de célula, o sobrenadante foi coletado para E-PAGE™ e análise de ligação.

[00279] E-PAGE™ (Life Technologies) foi usada como um alto

sistema de gel de alta produção para analisar simultaneamente 96 sondas em paralelo para uma quantificação de proteínas produzidas e purificadas termicamente. E-PAGE™ análise foi realizada de acordo com instruções do fabricante.

[00280] ELISA foi usada como técnica para analisar interações proteína-proteína. Cavidades de placas microtituladoras de 96 poços (Nunc MaxiSorp™, Thermo Fisher Scientific) foram revestidas com 1 µg FN-B, albumina sérica bovina (BSA, Eurobio), leite em pó, estreptavidina (Sigma Aldrich), T7-His-TEV-B (LD BioPharma), FN-B(8-14) (R&D Sistemas), lisozima, ovalbumina (GE Healthcare Life Science), aldolase (GE Healthcare Life Science) ou 0,6 µg anti-c-myc-anticorpo (M4439, Sigma) por toda a noite a 4 °C. Os poços foram lavados três vezes com PBS-T (1 x PBS com 0,1 % (p/v) Tween-20), bloqueados com 1x tampão de Caseína (Sigma Aldrich) diluído em PBS para 2 h a RT e lavados novamente como descrito. 20 µL de sobrenadante contendo a respectiva proteína de fusão purificada termicamente foram adicionados a 80 µL PBS-T ou 200 nM de proteína de fusão MC-Myc-010 (poços com anti-c-myc-anticorpo) diluídos em PBS-T, aplicados às cavidades e incubados por 1 h a 4 °C. Após lavagem três vezes com PBS-T, a ligação da respectiva variante foi detectada com um conjugado peroxidase do rábano silvestre (HRP)- anti-S-tag anticorpo (ab18589 ou ab19324, Abcam). Reação enzimática foi medida com TMB como um substrato cromogênico e interrompido com 0,2 M HCl após aproximadamente 5 min. A medição de absorbância a 450 nm foi realizada usando um Infinite M200 PRO Microplate Reader (Tecan).

[00281] A fim de comparar sinais de ligação entre diferentes placas, sinais de ELISA foram normalizados no controle de placa interno (ligação c-myc). Sinais de FN-B normalizados foram então referenciados nos sinais BSA normalizados para avaliar a capacidade de ligação de miniproteínas não de cistina selecionadas. Além do mais, os sinais de ligação alvos foram correlacionados à taxa de expressão de proteína, resultando em um valor de classificação para a identificação de acertos.

Produção miniproteína nó de cistina recombinante

[00282] A produção de proteína recombinante foi realizada usando células de expressão de SHuffle® T7 de *E. coli* que carregam vetor pET-32-LibEx que codificam para a respectiva minisequência de proteína nó de cistina em uma escala de 750-mL a 30 °C, 120 rpm. Após a cultura atingir uma OD₆₀₀ de aproximadamente 0,7, a indução de produção foi alcançada adicionando 750 µL 1 M IPTG e incubação a 25 °C, 120 rpm por toda a noite. Células de *E. coli* foram colhidas, ressuspensas em 10 mL tampão de equilíbrio, lisadas por sonificação e aquecidas a 80 °C por 10 min. Após centrifugação de resíduos de célula (15.000 x g por 30 min, 4 °C), o sobrenadante foi purificado por IMAC com uma coluna HisTrap 1 mL usando um sistema ÄKTAprime™ plus e um gradiente linear de 10-500 mM imidazolo em 20 min. As frações contendo proteína de fusão de miniproteína nó de cistina foram coletadas e dialisadas contra tampão de clivagem de trombina (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1,5 mM CaCl₂ e 5 % (p/v) glicerol, pH 8,45) a 4 °C por toda a noite.

[00283] Proteínas de fusão foram tanto diretamente usadas para ensaios baseados em ELISA quanto processadas adicionalmente no caso em que a miniproteína não marcada foi necessária, por exemplo, para análise SPR. Para isso, proteínas de fusão foram clivadas com 0,5 U de trombina (Sigma-Aldrich) por 1 mg de proteína e incubadas a 37 °C por toda a noite.

[00284] A separação de fragmentos de proteína foi realizada por cromatografia de fase reversa com Agilent 1260 Infinity Quaternary LC sistema (Agilent) e uma coluna REFONTE™ RPC 3 mL (GE Healthcare) usando um gradiente linear de 2-80 % acetonitrila em H₂O suplementado com 0,05 % ácido trifluoracético (TFA). As respectivas frações contendo miniproteína nó de cistina foram liofilizadas em um RVC 2-18-CD Plus SpeedVac (Christ) como uma etapa final. A quantidade de miniproteína nó de cistina foi determinada por pesagem

e os peptídeos foram armazenados na forma liofilizada a -20° C. A identidade foi verificada por espectrometria de massa com um Sistema LCMS Single Quad G6130B (Agilent Technologies) usando um protocolo de ionização por eletroaspersão padrão.

Mutagênese de varredura de alanina de MC-FN-010 selecionado

[00285] A fim de identificar os resíduos em MC-FN-010 que contribuem para ligação de EDB uma mutagênese de varredura de alanina foi realizada. Esse método inclui uma substituição sistêmica de aminoácidos contra alanina em posições de sequência definidas e subsequente análise de ligação dos mutantes gerados. Para geração de varredura de alanina mutações derivadas de MC-FN-010 foram tanto introduzidas por meio de PCR quanto toda a sequência de codificação foi montada por meio de síntese direta de fragmentos de GeneArt™ Strings™ (Thermo Fisher Scientific). Os respectivos fragmentos de DNA foram clonados em vetor de expressão pET-32-LibEx usando sítios de restrição *Bam*HI e *Kpn*I únicos e introduzidos em células competentes que expressam SHuffle® T7 de *E. coli* (New England BioLabs). Todas as mutações foram verificadas por sequenciamento de DNA. As variantes de mutagênese por varredura de alanina foram expressas no formato 24-poços usando 5 mL de meio de autoindução seletiva. A produção e purificação de proteína de fusão foram realizadas como aqui descrito para o formato de 96-poços, mas incluiu uma etapa de purificação adicional do sobrenadante usando colunas HisPur™ Ni-NTA spin (Thermo Fisher Scientific). A capacidade de ligação e especificidade de proteínas de fusão nó de cistina para o alvo e alvo fora de proteína foi realizada com um ensaio ELISA baseado em anticorpo como aqui descrito.

Espectroscopia de ressonância plasmônica de superfície

[00286] A cinética de ligação de ligantes de miniproteína nó de cistina monoméricos e triméricos a sua proteína alvo foi determinada

usando um dispositivo Biacore T-100 (GE Healthcare Life Science) com PBS-T como tampão de corrida. Para isso, a proteína FN-67B89 biotinizada (200-300 µg/mL) foi capturada pela ligação a uma célula de fluxo de um chip de sensor SA (GE Healthcare Life Science). Para analisar ligantes monoméricos, uma densidade alvo imobilizada de máximo 750 unidades de resposta (RU) foi aplicada e para variantes triméricas uma RU de máximo 400 foi visada. A análise de ligação de ligantes monoméricos foi realizada usando um método de cinética multiciclo com concentrações variando de 50 a 4000 nM. Um ciclo iniciou com um período de associação de 90 s, seguido por um período de dissociação de 420 s e uma etapa de regeneração final. A medição da cinética foi conduzida aplicando uma vazão de 20 µL/min. As variantes triméricas foram analisadas nas mesmas condições de associação e dissociação, mas usando o modo de medição cinética de um único ciclo em um fluxo constante de 30 µL/min. Nesse caso, a concentração de analito foi entre 1,25 nM e 10 nM. A cinética de ligação e análise de estado estacionário foram calculadas usando um modelo de ajuste cinético global (1:1 Langmuir, Biacore T-100 Evaluation Software, GE Healthcare Life Science).

Manchamento de Imunofluorescência

[00287] Para manchamento de imunofluorescência, pedaços de tumor ou cérebro criopreservados foram cortados em seções de cinco micra de espessura, fixados em acetona resfriada em gelo por 5 min e secas ao ar. Lâminas foram então bloqueadas em PBS com 3 % BSA a RT por 5 min. Para manchamento de EDB, 1 µg da respectiva miniproteína nó de cistina biotinizadas foi incubado com 2,9 µg estreptavidina-Cy3 conjugado (Rockland Immunochemicals) a RT por 30 min. O complexo pré-formado foi então adicionado às seções de tumor e incubado por 30 min a 37 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS contendo 1 % BSA. Manchamento de CD31 foi realizado com um anticorpo IgG CD31 rato anti-camundongo (clone

390, eBioscience) diluído 1:100 em PBS com 1 % BSA por 30 min a 37 °C. Após três etapas de lavagem em PBS, os núcleos de célula foram manchados com Höchst 33342 (Thermo Fisher Scientific) diluídos 1:5000 em PBS por 30 min a RT. As lâminas foram lavadas novamente como aqui descrito e cobertas com lamínulas em uma camada fina de meio de montagem (Dako). Imagens foram capturadas com um microscópio Zeiss Apotome (Carl Zeiss) e analisadas com software ZEN (Carl Zeiss).

Síntese de peptídeo

[00288] Ligantes conjugados Alexa Fluor trimérico 680 (AF680) bem como miniproteínas N-terminalmente biotinizadas foram adquiridas da Pepscan. Todos os construtos peptídicos obtidos foram armazenados como alíquotas de 100 µg a -20 °C. Para os experimentos, todos os peptídeos foram dissolvidos em 100 µL DPBS (Gibco) resultando em uma concentração de 1 µg/µL. Para todos os construtos, a identidade foi verificada por espectrometria de massa ESI e a pureza foi analisada por cromatografia analítica de fase reversa (Pepscan). Adicionalmente, trímeros foram analisados por meio de SDS-PAGE e SPR a fim de caracterizar as propriedades de ligação ao alvo (ligação a FN-67B89) e especificidade (ligação a FN-6789).

Modelo de xenoenxerto em camundongo MG U-87

[00289] A linhagem celular de glioblastoma de humano MG U-87 (ATCC) foi cultivada em meio EMEM (ATCC) suplementado com 10 % FCS em condições assépticas a 37 °C com 5 % CO₂ e 95 % de umidade.

[00290] Camundongos foram alojados na instalação de animal na BioNTech AG e todos os protocolos de animal foram aprovados pela Tierschutzkommission des Landesuntersuchungsamts Rheinland-Pfalz. Camundongos Fox n1/nu de quatro semanas de idade com pesos variando entre aproximadamente 25 e 28 g foram obtidos de Janvier. Para estudos de camundongo de xenoenxerto 7×10^6 células MG U-87

de humano foram subcutaneamente injetadas no flanco direito de camundongos Fox n1/nu e tumores cresceram naturalmente por aproximadamente cinco semanas. O tamanho do tumor subcutâneo foi determinado usando a fórmula de elipsoide (largura x comprimento² / 2). Todos os animais com volume de tumor entre 100-1200 mm³ foram incluídos nos estudos e camundongos foram aleatoriamente atribuídos a coortes experimentais.

Imagem in vivo e ex vivo

[00291] Camundongos carregando um tamanho de tumor desejado foram incluídos para análise de biodistribuição e alvejamento de tumor de construtos triméricos. Todos os construtos triméricos foram injetados intravenosamente por meio do plexo venoso retrobulbar em um volume final de 100 µl de tampão PBS (3,34 nmol/camundongo). Camundongos (n=3 para cada construto) foram imageados em um IVIS Spectrum System (Perkin Elmer) usando faixa de excitação de 615-665 nm e monitoramento de sinais de emissão a 695-770 nm. O processo de formação de imagem foi realizado 1 h, 2 h ou 6 h pós-injeção e após eutanização o tumor e órgãos específicos foram excisados, imageados, pesados e crio-conservados para análise posterior. A intensidade de fluorescência de regiões de interesse foi quantificada usando software Living Image[®] (PerkinElmer). Significância estatística foi calculada com base em conjuntos de dados em triplicata usando análise de ANOVA a duas variáveis em GraphPad Prism.

Exemplo 2: Classificação e seleção de ligantes EDB-específicos

[00292] Uma vez que miniproteínas nó de cistina mostraram ser idealmente adequadas como agentes para formação de imagem de tumor (Kimura *et al.* 2009; Moore *et al.* 2013; Miao *et al.* 2009; Soroceanu *et al.* 1998; Veiseh *et al.* 2007, Nielsen *et al.* 2010; Hackel *et al.* 2013; Zhu *et al.* 2014), usamos a sequência de cadeia aberta de inibidor de tripsina-II *Momordica cochinchinensis* (oMCoTI-II) como base

para uma construção de biblioteca fago combinatorial para selecionar ligantes de ligação alvos (Hernandez *et al.* 2000). Nossa primeira biblioteca (MCopt 1.0) compreende sequências com aminoácidos randomizados na primeira alça, posições dispersas na terceira alça e dois resíduos variáveis na frente da primeira cisteína. As minissequências de proteína nó de cistina foram geneticamente fundidas na proteína de revestimento principal (pVIII) de fagos M13. Além do mais, uma segunda biblioteca (MCopt 2.0) foi desenvolvida com randomização na primeira alça da sequência e uma apresentação de proteínas por meio da proteína de revestimento secundária (pIII) de fagos M13. As bibliotecas dessa forma distinguem nas posições de alça randomizadas e comprimento de sequência, bem como na valência de apresentação da proteína, que pode levar a variação no resultado de seleção de ligante. Ambas as bibliotecas foram aplicadas em paralelo a fim de identificar miniproteínas nó de cistina direcionadas contra o Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina que é conhecido por expressar altamente em diferentes entidades de tumor, enquanto ausentes na maioria dos tecidos normais, exceto o interstício de células do ovário e sinoviais (Carnemolla *et al.* 1989; Castellani *et al.* 1994).

[00293] Para gerar proteínas alvos e controle adequadas para a classificação subsequente e processo de identificação de acerto, produzimos recombinantemente o único domínio EDB (FN-B), EDB flanqueado pelo domínio tipo IIIs circundante (FN-67B89) e domínio tipo IIIs 6-9 sem EDB (FN-6789). Os tamanhos de proteína corretos de todas as variantes FN puderam ser confirmados e as purezas produzidas foram acima de 93 % como mostrado na figura 1 A. Pelo uso de um anticorpo monoclonal (BC-1), que distingue fibronectina contendo EDB e fibronectina sem EDB (Carnemolla *et al.* 1992), avaliamos um enovelamento nativo da proteína FN-67B89. Além disso, o H6-tag C-terminal foi detectado em todas as proteínas de fusão FN (figura 1 B). Ambas as bibliotecas de fago foram classificadas em três rodadas consecutivas contra FN-B biotiniladas e após o término quarenta e seis

clones simples foram sequenciados. Na classificação MCOpt 1.0 uma miniproteína nó de cistina foi fortemente enriquecida, dominando o agrupamento com 40 %. Adicionalmente, dois outros clones de miniproteínas nó de cistina foram enriquecidos com 4 % e 2 % (figura 2). No caso da classificação MCOpt 2.0 três diferentes clones de miniproteína nó de cistina foram enriquecidos a uma proporção de 13 %, 10 % e 2 % das sequências totais. Interessantemente, cinco de seis sequências amplificadas compreendem um motivo R-I/V-R-(L) comum na extremidade C-terminal da alça 1 (figura 2).

[00294] Encorajados por essas observações, avaliamos a capacidade de ligação de FN-B de sequências enriquecidas resultantes da classificação da biblioteca MCOpt 1.0. Para isso, miniproteínas nó de cistina foram expressas, C-terminalmente fundidas na tiorredoxina, his-tag e s-tag (Trx-miniproteína nó de cistina), em um formato em miniescala de 96-poços. A ligação de proteínas a FN-B e BSA foi ensaiada em um ELISA e adicionalmente a taxa de expressão de cada clone foi determinada por meio de análise E-PAGE[®]. Com base na razão sinal para ruído derivada e no valor da expressão, calculamos uma pontuação de classificação para cada candidato como uma medida para a interação FN-B. Três diferentes variantes de Trx-miniproteína nó de cistina mostraram uma maior interação para FN-B comparadas ao controle BSA (figura 3) e as sequências correspondem aos clones enriquecidos do agrupamento de classificação como previsto. Esses três candidatos bem como os clones contendo motivo R-I/V-R-(L) da classificação MCOpt2.0 foram incluídos para subsequente análise de ligação mais profunda.

Exemplo 3: Análise de especificidade de enriquecido miniproteína nó de cistina candidatas

[00295] Em seguida formados na especificidade de ligação ao alvo das seis miniproteínas nó de cistina restantes usando proteínas alvos EDB produzidas em casa (FN-B e FN-67B89) bem como proteína fora do

alvo (FN-6789) e diferentes proteínas controle (leite em pó, estreptavidina e albumina sérica bovina). FN-6789 representa uma proteína fora do alvo correspondente perfeita, em virtude de fibronectina que não possui Domínio Extra B ser expressa por muitos diferentes tipos de célula (Mao und Schwarzbauer 2005). Todos os candidatos exibem uma ligação ao alvo EDB razoável, sendo igualmente alta para proteínas alvos FN-B e FN-67B89 recombinantes (figura 4). Variantes escolhidas com base no motivo R-I/V-R-(L) comum (MCopt 1.0-2/-3 e MCopt 2.0-1/-2/-3) apresentaram médio a baixo sinais fora do alvo e de proteína de controle. Enquanto MCopt 1.0-2 e MCopt 1.0-3 foram já identificadas em MCopt 1.0 acertaram na identificação, MCopt 2.0-1, -2 e -3 só foram identificadas do agrupamento MCopt 2.0 com base em seu motivo comum e dessa forma não foram ensaiados para ligação ao alvo de FN-B antes. MCopt 1.0-1, entretanto que não contém o motivo R-I/V-R-(L) falhou na avaliação de especificidade, em virtude de termos observado uma alta interação para FN-6789 fora do alvo, bem como para todas as proteínas controles, exceto leite em pó. Esses dados indicam fortemente que o motivo aminoácido observado é relevante para ligação de EDB.

[00296] Então avaliamos adicionalmente a especificidade de EDB dos cinco candidatos promissores incluindo também T7-TEV-B comercialmente disponível (LD BioPharma), um domínio EDB T7-TEV N-terminalmente flanqueado, e FN-B(8-14) (R&D Sistemas), EDB com domínios C-terminal 8-13 e ½ de domínio 14. Novamente, sinais de ligação foram igualmente altos para todas as proteínas alvos contendo EDB testadas com sinais fora do alvo relativamente baixos (figura 5). Uma vez que todas as proteínas alvos usado apresentam EDB em diferentes formatos, EDB sozinho (FN-B), flanqueado por um construto N-terminal artificial (T7-His-TEV), flanqueado por domínio C- e N-terminal natural tipo IIIs (FN-67B89) bem como apenas flanqueado por seu domínio C-terminal tipo IIIs natural vizinho (FN-B(8-14)), pode-se concluir que as atividades de ligação observadas são certamente

específicas para o pedaço central de EDB.

[00297] Finalmente, geramos dados de ligação dependentes de dose de quatro candidatos contendo R-I/V-R-(L)-motivo (MCopt 1.0-2/-3 e MCopt2.0 -1/-2) para FN-B, FN-67B89 e FN-B(8-14) com diferentes concentrações de saturação de receptor, como apresentado na figura 6. Sinais de fundo observados para FN-6789 fora do alvo são em geral muito menores que para todos as proteínas alvos contendo EDB, que indica uma clara discriminação entre fibronectina domínio tipo IIIs em FN-6789 e EDB. Como já foi visto em ELISAs de especificidade antes, o clone MCopt 2.0-3 ilustra um alto grau de ligação não específica para o FN-6789 fora do alvo. Mesmo que o clone MCopt 2.0-3 compartilhe o R-I/V-R-(L) -motivo comum que parece ter uma função crucial na ligação ao alvo de EDB, outros resíduos na alça de miniproteína nó de cistina randomizada pode facilitar a ligação não específica, por exemplo, por causa de interações hidrofóbicas.

[00298] Para a aplicação pretendida de miniproteína nó de cistina como agente de imageamento, então estudamos a capacidade de ligação de proteínas sem tag por análise de ressonância plasmônica de superfície (SPR). Surpreendentemente, apenas MCopt 1.0-3 revelou forte ligação para proteína alvo FN-67B89 em todos os cinco candidatos na faixa de concentração testada de 50 -1000 nM (dados não mostrados). Portanto, MCopt 1.0-3, a seguir denominados MC-FN-010, foi escolhida para análise adicional e desenvolvimento de sonda de imageamento óptico.

Exemplo 4: Mapeamento do sítio de ligação MC-FN-010

[00299] Mesmo que nossas observações anteriores do motivo de aminoácido R-I/V-R-(L) em diferentes miniproteínas nó de cistina selecionadas já sugerissem uma alta contribuição de sequência para ligação de EDB, então avaliamos experimentalmente sua relevância com mais detalhe. Substituições de alanina simples nas sequências alvos de MC-FN-010 foram abordadas e levaram no total a quatorze construtos

derivados (consecutivamente enumerados de MC-FN-011 até MC-FN-0114 como mostrado na figura 7 A). Todos os construtos foram testados em relação a FN-B de domínio simples. Como previsto, sete construtos com trocas de alanina no início da sequência ainda apresentaram forte interação com o alvo, sugerindo que essas posições não são cruciais para a ligação de EDB. Ao contrário, quatro construtos com troca nas posições de motivo comuns revelaram perda de ligação. Uma substituição de alanina adicional na quinta alça também levou a uma reduzida interação com o alvo, indicando sua relevância igualmente (figura 7 B). Esses resultados confirmam que quatro resíduos de aminoácidos na primeira alça (RIRL) e também o resíduo de arginina na quinta alça têm um efeito direto na interação de ligação a FN-67B89 ou uma influência indireta na conformação de miniproteína como sumarizado na figura 7 C.

Exemplo 5: Análise de especificidade de miniproteína MC-FN-010 parental em tecidos de tumor

[00300] Adicionalmente estudamos a especificidade de MC-FN-010 parental em um contexto celular usando uma seção de xenoinxerto de tumor MG U-87 compreendendo a proteína EDB natural no microambiente. Tumores de glioblastoma de humano são conhecidos para abrigar a fibronectina EDB isoforma em estruturas vasculares (Mariani *et al.* 1997). Com base em mutagênese de varredura de alanina, geramos um construto controle negativo (MC-FN-0115) com substituições de alanina em três posições (PMCTQ**RANRIA**AA**CR**RDSCTGACICRGNGYCG). Para experimentos de imageamento por imunofluorescência MC-FN-010 e MC-FN-0115 como formatos biotiniladas foram tetramerizados com estreptavidina Cy3-marcada. MC-FN-010-biotetramerizada praticamente apenas decoraram áreas em torno de vasos confirmadas com um anticorpo Alexa Fluor 647-conjugado contra CD31, uma proteína de superfície ubiquitosamente expressa de células endoteliais reputadas como

marcador vascular (figura 8). A fusão de imagem de Cy3 e Alexa Fluor 647 demonstra a colocalização de ambos os sinais de fluorescência associados a vasos sanguíneos. Além do mais, uma localização de MC-FN-010 tetramerizado em áreas perivasculares circundantes poderia ser detectada. Ao contrário, seções de tumor MG U-87 manchadas com o construto controle negativo MC-FN-0115 não mostraram sinal de fluorescência absolutamente (figura 8). Não foi observado nenhum sinal de fluorescência para MC-FN-010 e MC-FN-0115 tetramerizado na seção de cérebro de camundongo normal (figura 12).

Exemplo 6: Ligação e afinidade de miniproteínas nó de cistina a FN-67B89

[00301] Antes da um uso de proteínas de alveamento como ferramenta de diagnóstico, elas precisam ser especificamente conjugadas com agentes de imageamento (Spicer und Davis 2014). Nosso candidato principal MC-FN-010 contém uma lisina na alça um, que não é favorável para ligação de agente seletiva a amins primárias. Com base em nossa análise anterior, esse aminoácido does na contribui ativamente para ligação de EDB, e assim escolhemos um construto derivado MC-FN-016 como um segundo candidato. Observamos uma ligação de Trx-MC-FN-016 para FN-67B89 de uma maneira dependente da dose com sinais que foram equiparáveis a Trx-MC-FN-010 parental (figura 9). Ao contrário, o sinal de fundo geral para FN-6789 foi continuamente relativamente baixo. Ambos os candidatos de miniproteína nó de cistina exclusivamente alvejam FN-67B89 sem interação para FN-6789, que é importante uma vez que fibronectina é amplamente expressa em múltiplos tipos de célula (Pankov und Yamada 2002). As afinidades de MC-FN-010 e MC-FN-016 sem tag para biotiniladas FN-67B89 foram ensaiadas por análise SPR. A cinética de ligação de ambas as miniproteínas nó de cistina revelou baixa afinidade de ligação na faixa de um dígito micromolar com fora das taxas rápidas (figura 10 A).

Exemplo 7: Geração e avaliação de uma sonda de imageamento óptico EDB-específica

[00302] Para obter uma maior força de ligação, os ligantes foram quimicamente trimerizados por meio de ligação de oxima para tirar vantagem de um efeito de avidéz potencial. Adicionalmente, a molécula foi alvejada com um corante de fluorescência próximo ao infravermelho, Alexa Fluor 680, para permitir uma observação da distribuição e localização após administração em camundongos. Após síntese química de todos os três construtos triméricos, diferentes ensaios foram realizados a fim de controlar o correto tamanho e pureza. SDS-PAGE e análise de cromatografia de fase reversa não revelaram conspicuidades críticas em todos os construtos (dados não mostrados). Notadamente, nossa estratégia de oligomerização levou a afinidade enormemente melhorada tanto de miniproteínas nó de cistina de ligação a EDB (AF680-(MC-FN-010)₃ quanto AF680-(MC-FN-016)₃) resultando em uma constante de afinidade picomolar três dígitos e foras de taxa notadamente menores comparado a variantes monoméricas (figura 10 B).

[00303] Previamente, foi mostrado que outras moléculas de alvejamento de EDB foram aplicadas como reagente de diagnóstico para imagear glioblastomas (Albrecht *et al.* 2016; Mohammadgholi *et al.* 2017). Para isso, focamos na viabilidade de nossas miniproteínas nó de cistina de ligação a EDB para alvejar camundongos Fox n1/nu que portam glioblastoma de humano. Imageamento de corpo total e *ex vivo* de órgãos foi realizada após injeção intravenosa (r. o.) de 3,34 nmol AF680-(MC-FN-010)₃, AF680-(MC-FN-016)₃ e o controle negativo AF680-(MC-FN-0115)₃. A Figura 11 A apresenta imagens de fluorescência com fortes sinais de tumor resultantes de AF680-(MC-FN-010)₃ e AF680-(MC-FN-016)₃ comparado ao controle negativo AF680-(MC-FN-0115)₃. Todos os construtos triméricos puderam também ser detectados em fígado, bexiga e rim no quadro de tempo inicial. Após 6 h

os diferentes sinais de órgão diminuíram, exceto para a bexiga, mas importantemente o sinal de tumor gerado por AF680-(MC-FN-010)₃ e AF680-(MC-FN-016)₃ permaneceu. Além disso, os sinais de fluorescência dos órgãos foram correlacionados com seus respectivos pesos como representado na figura 11 B. O AF680-(MC-FN-010)₃ parental tem sinais de tumor significativamente mais fortes em comparação ao controle negativo em todos os pontos de tempo. Entretanto, AF680-(MC-FN-016)₃ revelou menores sinais que AF680-(MC-FN-010)₃, mas, no entanto, mais altos que o controle negativo AF680-(MC-FN-0115)₃.

Exemplo 8: Ligação específica de MC-FN-010 a seções de tecido derivadas da linhagem celular de glioblastoma MG U-87 de humano crescido como tumor de enxerto de camundongo.

[00304] Pedados de tumor ou cérebro criopreservados foram cortados em seções de seis micra de espessura, fixadas em acetona resfriada em gelo por 5 min e secas ao ar. As lâminas foram então bloqueadas em PBS com 3 % BSA a RT por 5 min. Para manchamento de EDB, 0,1 µg AF680-(MC-FN-010)₃ e anticorpo CD31 anti-camundongo (RB-10333-P1, Thermo Fisher) diluído 1:100 em PBS com 1 % BSA foi então adicionado às seções de tumor e incubados por 30 min a 37 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS contendo 1 % BSA. Manchamento CD31 de anticorpo anti-camundongo primário CD31 foi detectado com um anticorpo anti-coelho secundário IgG-Cy3 (111-165-003, Jackson ImunoResearch) diluído 1:400 em PBS com 1 % BSA por 30 min a 37 °C. Após três etapas de lavagem em PBS, os núcleos de célula foram manchados com Höchst 33342 (Thermo Fisher Scientific) diluídos 1:5000 em PBS por 30 min a RT. As lâminas foram lavadas novamente como aqui descrito e cobertas com laminulas em uma fina camada de meio de montagem (Dako). Imagens foram capturadas com um microscópio Zeiss Apotome (Carl Zeiss) e analisadas com software ZEN (Carl Zeiss). A Figura 13 apresenta um

manchamento de imunofluorescência adicional com os construtos triméricos (AF680-(MC-FN-010)₃ e controle AF680-(MC-FN-0115)₃) em amostras de tecido de tumor de enxerto de glioblastoma e normal de cérebro de humano. AF680-(MC-FN-010)₃ manchou as áreas em torno dos vasos de tumor em seções MG U-87 que foram localizadas com o marcador vascular CD31, enquanto o controle AF680-(MC-FN-0115)₃ não apresentou absolutamente nenhum manchamento. Não foi observado nenhum manchamento na seção normal do cérebro de camundongo com AF680-(MC-FN-010)₃, indicando especificidade de vasculatura do tumor.

Exemplo 9: Alveamento de tumor específico com miniproteína nó de cistina selecionada.

[00305] O modelo de xenoenxerto em camundongo MG U-87 surgiu como descrito no Exemplo 1 (modelo de xenoenxerto em camundongo MG U-87).

[00306] Para experimento de competição *in vivo*, camundongos portando um tamanho de tumor desejado (~ 200 mm³) foram injetados intravenosamente por meio do plexo venoso retrobulbar com a sonda trimérica não marcada (DOTA-(MC-FN-016)₃) em 3- ou 5 vezes excesso molar como competidor junto com trímero AF680-marcado (3,34 nmol). Camundongos foram imageados em um IVIS Spectrum System (Perkin Elmer) usando faixa de excitação de 615-665 nm e monitoramento de sinais de emissão a 695-770 nm. O processo de imageamento de camundongos total foi realizado 1 h, 2 h ou 6 h pós-injeção. Após 6 h os camundongos foram eutanizados, tumor e órgãos específicos foram excisados, imageados, pesados e crioconservados para análise posterior. A intensidade de fluorescência de regiões de interesse foi quantificada usando software Living Image® (PerkinElmer). A cinética de intensidade de fluorescência do tumor nesses camundongos foi comparada por imageamento *in vivo* e *ex vivo* aos de camundongos, que foram tratados com AF680-(MC-FN-016)₃ marcados sem competidor. DOTA-(MC-FN-

016)₃ foi bem adequado para o experimento de competição já que a constante de ligação aparente medida para FN-67B89 foi equiparável a AF680-(MC-FN-016)₃ (figura 15). Os sinais de tumor medidos *in vivo* em camundongos tratados com o competidor foram substancialmente reduzidos em cada ponto de tempo (figura 14 A). Como em experimentos anteriores (figura 11), o peptídeo controle negativo AF680-(MC-FN-0115)₃ não apresentou enriquecimento no tumor. Após 6 h os camundongos foram eutanizados, o tumor e órgãos foram excisados, e análise de imageamento por fluorescência *ex vivo* (figura 14 B) foi realizada. As intensidades de fluorescência medidas foram normalizadas no peso do tumor. Competição por trímero não marcado foi confirmada e a dependência de redução de sinal da dose do competidor foi observada (figura 14 C). A injeção do competidor 30 min antes do trímero marcado foi considerada mais eficaz comparada a sua injeção concorrente.

[00307] Nosso estudo descreve a seleção de uma miniproteína nó de cistina (MC-FN-010) de uma biblioteca fago contra EDB recombinante. MC-FN-010 e seu MC-FN-016 derivado foram modificados geneticamente como andaimes moleculares para as abordagens formação de imagem de tumor. Ambas EDB-moléculas de ligação apresentaram forte acúmulo em tumor de xenoinxerto de U87-MG e baixos sinais de fundo exceto para os rins. Esses resultados demonstram o alto potencial de MC-FN-010 e MC-FN-016 como agentes para tecnologia de diagnóstico de tumor.

REFERÊNCIAS

Albrecht, Valerie; Richter, Antonia; Pfeiffer, Sarah; Gebauer, Michaela; Lindner, Simon; Gieser, Eugenie *et al.* (2016): Anticalins directed against the fibronectin extra domain B as diagnostic tracers for glioblastomas. In: *International journal of cancer* 138 (5), S. 1269–1280. DOI: 10.1002/ijc.29874.

Barbas, Carlos F.; Burton, D. R.; Scott, J. K.; Silverman, G. J. (2004): Phage Display: Cold Spring Harbor Laboratory Pr.

Carnemolla, B.; Balza, E.; Siri, A.; Zardi, L.; Nicotra, M. R.; Bigotti, A.; Natali, P. G. (1989): A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative *splicing* of messenger RNA precursors. In: *The Journal of cell biology* 108 (3), S. 1139–1148.

Carnemolla, Barbara; Leprini, Alessandra; Allemanni, Giorgio; Saginati, Marc; Zardi, Luciano (1992): The inclusion of the type III repeat ED-B in the fibronectin molecule generates conformational modifications that unmask a cryptic sequence. In: *Journal of Biological Chemistry* 267 (34), S. 24689–24692.

Castellani, Patrizia; Viale, Giuseppe; Dorcaratto, Alessandra; Nicolo, Guido; Kaczmarek, Janusz; Querze, Germano; Zardi, Luciano (1994): The fibronectin isoform containing the ed-b oncofetal domain. A marker of angiogenesis. In: *Int. J. Cancer* 59 (5), S. 612–618. DOI: 10.1002/ijc.2910590507.

Hackel, Benjamin J.; Kimura, Richard H.; Miao, Zheng; Liu, Hongguang; Sathirachinda, Ataya; Cheng, Zhen *et al.* (2013): 18F-fluorobenzoate-labeled cystine knot peptides for PET imaging of integrin $\alpha\beta 6$. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 54 (7), S. 1101–1105. DOI: 10.2967/jnumed.112.110759.

Hernandez, J. F.; Gagnon, J.; Chiche, L.; Nguyen, T. M.; Andrieu, J. P.; Heitz, A. *et al.* (2000): Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. In: *Biochemistry* 39 (19), S. 5722–5730.

Kimura, Richard H.; Cheng, Zhen; Gambhir, Sanjiv Sam; Cochran, Jennifer R. (2009): Engineered *knottin* peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects. In: *Cancer*

Research 69 (6), S. 2435–2442. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2495.

Mao, Yong; Schwarzbauer, Jean E. (2005): Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 24 (6), S. 389–399. DOI: 10.1016/j.matbio.2005.06.008.

Mariani, G.; Lasku, A.; Balza, E.; Gaggero, B.; Motta, C.; Di Luca, L. *et al.* (1997): Tumor targeting potential of the monoclonal antibody BC-1 against oncofetal fibronectin in nude mice bearing human tumor implants. In: *Cancer* 80 (12 Suppl), S. 2378–2384.

Miao, Zheng; Ren, Gang; Liu, Hongguang; Kimura, Richard H.; Jiang, Lei; Cochran, Jennifer R. *et al.* (2009): An engineered *knottin* peptide labeled with 18F for PET imaging of integrin expression. In: *Bioconjugate chemistry* 20 (12), S. 2342–2347. DOI: 10.1021/bc900361g.

Mohammadgholi, Mohsen; Sadeghzadeh, Nourollah; Erfani, Mostafa; Abediankenari, Saeid; Abedi, Seyed Mohammad; Emrarian, Iman *et al.* (2017): Human Fibronectin Extra-Domain B (EDB)-Specific Aptide (APTEDB) Radiolabelling with Technetium-99m as a Potent Targeted Tumour-Imaging Agent. In: *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. DOI: 10.2174/1871520617666170918125020.

Moore, Sarah J.; Hayden Gephart, Melanie G.; Bergen, Jamie M.; Su, YouRong S.; Rayburn, Helen; Scott, Matthew P.; Cochran, Jennifer R. (2013): Engineered *knottin* peptide enables noninvasive optical imaging of intracranial medulloblastoma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (36), S. 14598–14603. DOI: 10.1073/pnas.1311333110.

Nielsen, Carsten H.; Kimura, Richard H.; Withofs, Nadia; Tran, Phuoc T.; Miao, Zheng; Cochran, Jennifer R. *et al.* (2010): PET

imaging of tumor neovascularization in a transgenic mouse model with a novel ^{64}Cu -DOTA-*knottin* peptide. In: *Cancer Research* 70 (22), S. 9022–9030. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1338.

Pankov, Roumen; Yamada, Kenneth M. (2002): Fibronectin at a glance. In: *Journal of cell science* 115 (20), S. 3861–3863.

Soroceanu, L.; Gillespie, Y.; Khazaeli, M. B.; Sontheimer, H. (1998): Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. In: *Cancer Research* 58 (21), S. 4871–4879.

Spicer, Christopher D.; Davis, Benjamin G. (2014): Selective chemical protein modification. In: *Nature communications* 5, S. 4740. DOI: 10.1038/ncomms5740.

Veisheh, Mandana; Gabikian, Patrik; Bahrami, S-Bahram; Veisheh, Omid; Zhang, Miqin; Hackman, Robert C. *et al.* (2007): Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. In: *Cancer Research* 67 (14), S. 6882–6888. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3948.

Zhu, Xiaohua; Li, Jinbo; Hong, Yeongjin; Kimura, Richard H.; Ma, Xiaowei; Liu, Hongguang *et al.* (2014): $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled cystine knot peptide targeting integrin $\alpha\beta_6$ for tumor SPECT imaging. In: *Molecular Pharmaceutics* 11 (4), S. 1208–1217. DOI: 10.1021/mp400683q.

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, caracterizado por que compreende o motivo da sequência de aminoácidos Arg-Ile/Val-Arg.

2. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que compreende o motivo da sequência de aminoácidos Arg-Ile/Val-Arg-Leu.

3. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com a Reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** por que compreende a sequência de aminoácidos:

(Xaa)_{n1} Cys (Xaa)_{n2} Arg Ile/Val Arg (Xaa)_{n3} Cys (Xaa)_{n4}
Cys (Xaa)_{n5} Cys (Xaa)_{n6} Cys (Xaa)_{n7} Cys (Xaa)_{n8}

em que

os resíduos Cys formam uma estrutura de nó de cistina,

Xaa é independentemente um do outro qualquer aminoácido e

n₁, n₂, n₃, n₄, n₅, n₆, n₇, e n₈ são os respectivos números de aminoácidos,

em que a natureza dos aminoácidos Xaa e/ou o número de aminoácidos n₁, n₂, n₃, n₄, n₅, n₆, n₇ e n₈ são de maneira tal que uma estrutura de nó de cistina possa se formar entre os resíduos Cys.

4. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** por que

n₁ é 0 a 4, preferivelmente 1 ou 2,

n₂ é 3 a 10, preferivelmente 4, 5, 6 ou 7,

n_3 é 0 a 4, preferivelmente 0 ou 1,

n_4 é 3 a 7, preferivelmente 4, 5 ou 6,

n_5 é 2 a 6, preferivelmente 2, 3 ou 4,

n_6 é 1 a 3, preferivelmente 1 ou 2,

n_7 é 3 a 7, preferivelmente 4, 5 ou 6 e

n_8 é 0 a 4, preferivelmente 1 ou 2.

5. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com a Reivindicação 3 ou 4, **caracterizado** por que $(Xaa)_{n_3}$ é Leu ou está ausente, preferivelmente em que $(Xaa)_{n_3}$ é Leu.

6. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 3 a 5, **caracterizado** por que $(Xaa)_{n_2}$ é $(Xaa)_{n_2'}$ Asn, em que preferivelmente n_2' é 2 a 9, preferivelmente 3, 4, 5 ou 6.

7. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 3 a 6, **caracterizado** por que $(Xaa)_{n_7}$ é Arg $(Xaa)_{n_7'}$, em que preferivelmente n_7' é 2 a 6, preferivelmente 3, 4 ou 5.

8. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 3 a 7, **caracterizado** por que

n_2 é 5 ou 6 ou n_2' é 4 ou 5,

n_3 é 0 ou 1,

n_4 é 5,

n_5 é 3,

n_6 é 1 e

n7 é 5 ou n7' é 4.

9. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 3 a 8, **caracterizado** por que compreende a sequência de aminoácidos:

(Xaa)n1 Cys (Xaa)n2 Arg Ile/Val Arg (Xaa)n3 Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys (Xaa)n5 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys (Xaa)n8.

10. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 3 a 9, **caracterizado** por que compreende a sequência de aminoácidos:

(Xaa)n1 Cys (Xaa)n2 Arg Ile/Val Arg (Xaa)n3 Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys (Xaa)n5 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly.

11. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 10, **caracterizado** por que Ile/Val é Ile.

12. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 10, **caracterizado** por que Ile/Val é Val.

13. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 12, **caracterizado** por que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

(i) TrpLysCysGlnProThrAsnGlyTyrArgIleArgCysArgArgAsp SerAspCysProGlyAspCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(ii) SerValCysLysAsnValSerIleMetArgIleArgLeuCysArgArgAsp SerAspCysProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(iii) SerValCysAlaHisTyrAsnThrIleArgValArgLeuCysArgArg AspSerAspCysProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(iv) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(v) SerValCysLysGlnAlaAsnPheValArgIleArgLeuCysArgArg
AspSerAspCysProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(vi) AlaMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(vii) ProAlaCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(viii) ProMetCysAlaGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(ix) ProMetCysThrAlaArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(x) ProMetCysThrGlnAlaLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(xi) ProMetCysThrGlnArgAlaAsnArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(xii) ProMetCysThrGlnArgLysAlaArgIleArgLeuCysArgArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,

(xiii) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysAlaArgAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly, e

(xiv) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgAlaAsp
SerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly.

14. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina,
de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 13,
caracterizado por que forma ou é parte de um andaime.

15. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina,

de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 14, **caracterizado** por que é estabilizado por uma modificação covalente.

16. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com a Reivindicação 15, **caracterizado** por que a dita modificação covalente é ciclização.

17. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com a Reivindicação 16, **caracterizado** por que a dita ciclização é por meio de uma ou mais pontes de dissulfeto.

18. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 17, **caracterizado** por que forma e/ou é parte de uma estrutura de nó de cistina, preferivelmente estrutura de nó de cistina inibidor.

19. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 18, **caracterizado** por que o motivo da sequência de aminoácidos é localizado na alça 1 de uma estrutura de nó de cistina, preferivelmente estrutura de nó de cistina inibidor, preferivelmente na extremidade C-terminal da alça 1 de uma estrutura de nó de cistina, preferivelmente estrutura de nó de cistina inibidor.

20. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com a Reivindicação 18 ou 19, **caracterizado** por que a estrutura de nó de cistina é baseada no inibidor de cadeia aberta de tripsina II de *Momordica cochinchinensis* (oMCoTI-II).

21. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 20, **caracterizado** por que compreende ainda pelo menos um parceiro de fusão.

22. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina,

de acordo com a Reivindicação 21, **caracterizado** por que o parceiro de fusão compreende uma sequência de aminoácidos heteróloga.

23. Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, caracterizado por que compreende o peptídeo de ligação do domínio extra B (EDB) da fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22.

24. Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com a Reivindicação 23, **caracterizado** por que o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, é covalentemente e/ou deixa de ser covalentemente, preferivelmente covalentemente associado com pelo menos uma fração adicional.

25. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com a Reivindicação 21 ou 22, ou **Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina,** de acordo com a Reivindicação 24, **caracterizado(s)** por que o parceiro de fusão ou fração adicional compreende uma proteína transportadora, marcador, repórter ou tag.

26. Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 25, **caracterizado** por que compreende pelo menos duas subunidades que são covalentemente e/ou deixam de ser covalentemente associadas, cada uma das ditas subunidades compreendendo um peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22 e 25, em que os peptídeos de ligação de EDB podem ser idênticos ou diferentes.

27. Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que compreende pelo menos quatro subunidades.

28. Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina,

de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que compreende pelo menos três subunidades.

29. Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, caracterizado por que compreende o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22 e 25 ou o agente de ligação de domínio extra B (EDB) da fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 23 a 28, covalentemente e/ou deixa de ser covalentemente, preferivelmente covalentemente associado com pelo menos um marcador ou repórter detectável e/ou pelo menos uma fração de efector terapêutico.

30. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22 e 25, ou **Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina,** de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 29, **caracterizado(s)** por que se liga a epítomos nativos de EDB.

31. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25 e 30, ou **Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina,** de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 30, **caracterizado(s)** por que o dito EDB é expresso por células endoteliais e/ou células de tumor.

32. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25, 30 e 31, ou **Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina,** de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 31, **caracterizado(s)** por que a dita ligação é uma ligação específica.

33. Ácido Nucléico Recombinante, caracterizado por que codifica um peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme

definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25 e de 30 a 32.

34. Célula Hospedeira, caracterizada por que compreende um ácido nucléico recombinante, conforme definido na Reivindicação 33.

35. Kit de Teste, caracterizado por que compreende o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25, e 30 a 32 ou o agente de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 23 a 32.

36. Kit de Teste, de acordo com a Reivindicação 35, **caracterizado** por que é um kit de teste de diagnóstico.

37. Dispositivo de Ensaio, caracterizado por que compreende o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25 e de 30 a 32 ou o agente de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 23 a 32.

38. Dispositivo de Ensaio, de acordo com a Reivindicação 37, **caracterizado** por que o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina ou o agente de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, é liberavelmente ou deixa de ser liberavelmente imobilizado em um suporte sólido.

39. Método Para Ensaiar Presença e/ou Quantidade Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina em Amostra, caracterizado por que compreende usar o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25 e de 30 a 32 ou o agente de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 23 a 32.

40. Método para Diagnóstico, Detecção ou Monitoramento de Câncer em Paciente, caracterizado por que compreende ensaiar quanto a presença e/ou quantidade Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina no dito paciente usando o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25 e de 30 a 32 ou o agente de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 23 a 32.

41. Método para Diagnóstico, Detecção ou Monitoramento de Câncer em Paciente, de acordo com a Reivindicação 40, **caracterizado** por que o dito ensaio é realizado em uma amostra biológica isolada do dito paciente.

42. Método para Diagnóstico, Detecção ou Monitoramento de Câncer em Paciente, de acordo com a Reivindicação 40 ou 41, **caracterizado** por que a presença de EDB ou uma quantidade EDB que é maior comparada a uma referência sem câncer indica que o paciente tem câncer.

43. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 42, **caracterizado** por que ensaiar quanto a presença e/ou quantidade EDB compreende:

- (i) contatar uma amostra com o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, ou o agente de ligação de EDB, e
- (ii) detectar a formação e/ou determinar a quantidade um complexo entre o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, ou o agente de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, e EDB.

44. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 43, **caracterizado** por que o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, ou o agente de ligação de domínio extra B (EDB)

de fibronectina, compreende ou é conjugado a pelo menos um marcador ou repórter detectável.

45. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 44, **caracterizado** por que o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, ou o agente de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, é liberavelmente ou deixa de ser liberavelmente imobilizado em um suporte sólido.

46. Composição Farmacêutica, caracterizada por que compreende o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25, e 30 a 32, o agente de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 23 a 32, o ácido nucléico recombinante, conforme definido na Reivindicação 33, ou a célula hospedeira, conforme definida na Reivindicação 34.

47. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25 e de 30 a 32, **Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 32, **Ácido Nucléico Recombinante**, de acordo com a Reivindicação 33, **Célula Hospedeira**, de acordo com a Reivindicação 34, ou **Composição Farmacêutica**, de acordo com a Reivindicação 46, **caracterizados** por que é para uso em terapia, em particular para uso no tratamento ou prevenção de câncer em um paciente.

48. Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25 e de 30 a 32, ou **Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 32, **caracterizado(s)** por que é para uso no alvejamento de câncer em um paciente.

49. Método de Tratamento de Paciente, compreendendo administrar ao paciente o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, 25, e 30 a 32, o agente de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 23 a 32, o ácido nucléico recombinante, conforme definido na Reivindicação 33, a célula hospedeira, conforme definida na Reivindicação 34 ou a composição farmacêutica, conforme definida na Reivindicação 46, **caracterizado** por que, preferivelmente, o paciente tem câncer ou está em risco desenvolver câncer.

50. Composição Farmacêutica, de acordo com a Reivindicação 46, **Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, Ácido Nucléico Recombinante, Célula Hospedeira ou Composição Farmacêutica**, de acordo com a Reivindicação 47, **Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina** ou **Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina**, de acordo com a Reivindicação 48, ou **Método Para Tratamento de Paciente**, de acordo com a Reivindicação 49, **caracterizado(a)** por que o peptídeo de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, ou o agente de ligação de domínio extra B (EDB) de fibronectina, compreende ou é conjugado a pelo menos uma fração de efector terapêutico.

51. Método Para Tratamento de Paciente, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 40 a 45, **Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (EDB), Agente de Ligação de Domínio Extra B (EDB) de Fibronectina, Ácido Nucléico Recombinante, Célula Hospedeira ou Composição Farmacêutica**, de acordo com a Reivindicação 47 ou 50, **Peptídeo de Ligação de Domínio Extra B (Edb) de Fibronectina**, ou **Agente de Ligação de Domínio Extra B (Edb) de Fibronectina**, de acordo com a Reivindicação 48 ou 50, ou **Método**, de acordo com a Reivindicação 49 ou 50, **caracterizado(s)** por

que o câncer é EDB-positivo e/ou envolve células que expressam EDB.

52. Uso do Peptídeo de Ligação de Fibronectina Extra Domínio B (EDB), conforme definido nas Reivindicações independentes 1 ou 29 e respectivas dependentes, **caracterizado** por que é na fabricação de um medicamento para diagnose, detecção ou monitoramento de câncer em um paciente .

53. Uso de Ácido Nucleico Recombinante, conforme definido na Reivindicação independente 33, **caracterizado** por que é na fabricação de um medicamento para diagnose, detecção ou monitoramento de câncer em um paciente.

54. Uso de Composição Farmacêutica, conforme definido na Reivindicação independente 46, **caracterizado** por que é na fabricação de um medicamento para diagnose, detecção ou monitoramento de câncer em um paciente.

Figura 1

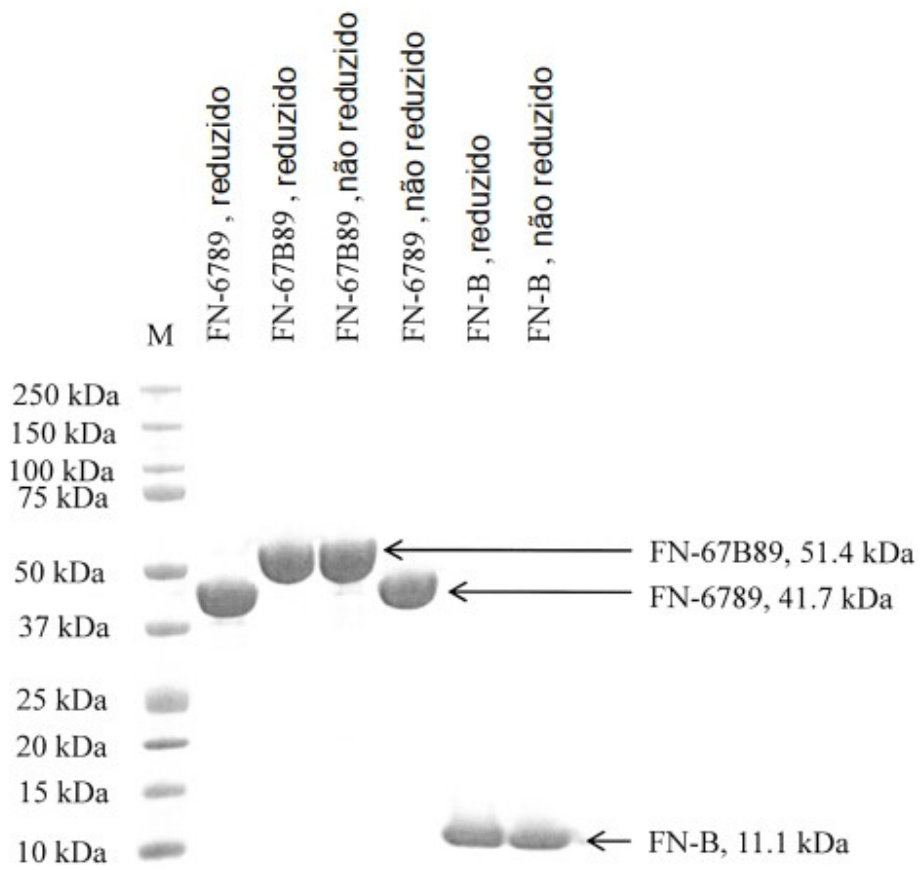
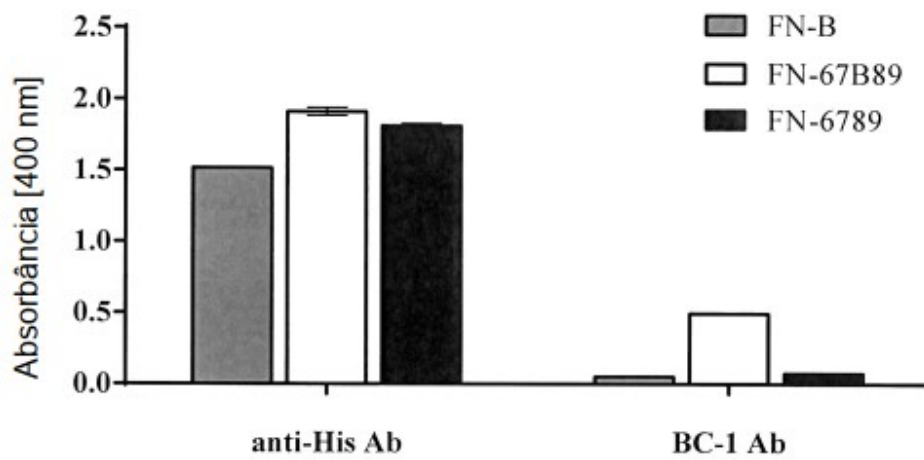
A**B**

Figura 2

Nome do clone	Sequência de miniproteína cistina-knot	Proporção de sequências totais (%)
MCopt 1.0-2	W KCQPTNGYRIR <u>CRR</u> RDSDCPGDCICRGNGYCG	40
MCopt 2.0-2	SVCKNV SIMRIRL <u>CRR</u> RDSDCPGACICRGNGYCG	13
MCopt 2.0-1	SVCAHYNTIR <u>VRLCRR</u> RDSDCPGACICRGNGYCG	10
MCopt 1.0-1	W TCTKKYPNTIS <u>CRR</u> RDSDCRVTCICRGNGYCG	4
MCopt 1.0-3	P MCTQRKNR <u>IRL</u> CRRDSDCTGACICRGNGYCG	2
MCopt 2.0-3	SVC KQANFVRIRL <u>CRR</u> RDSDCPGACICRGNGYCG	2

Figura 3

Nome do clone	Valor de classific.	Sequência de proteína
MCopt 1.0-1	3,7 a 1,7	WTCTKKYPNTISCRRDSDCRVTCICRGNNGYCG
MCopt 1.0-2	2,7 a 1,6.	WKCQPTNGYRIRCRRDSDCPGDCICRGNNGYCG
MCopt 1.0-3	2,6 a 0,6	PMCTQRKNRILCRRDSDCTGACICRGNNGYCG

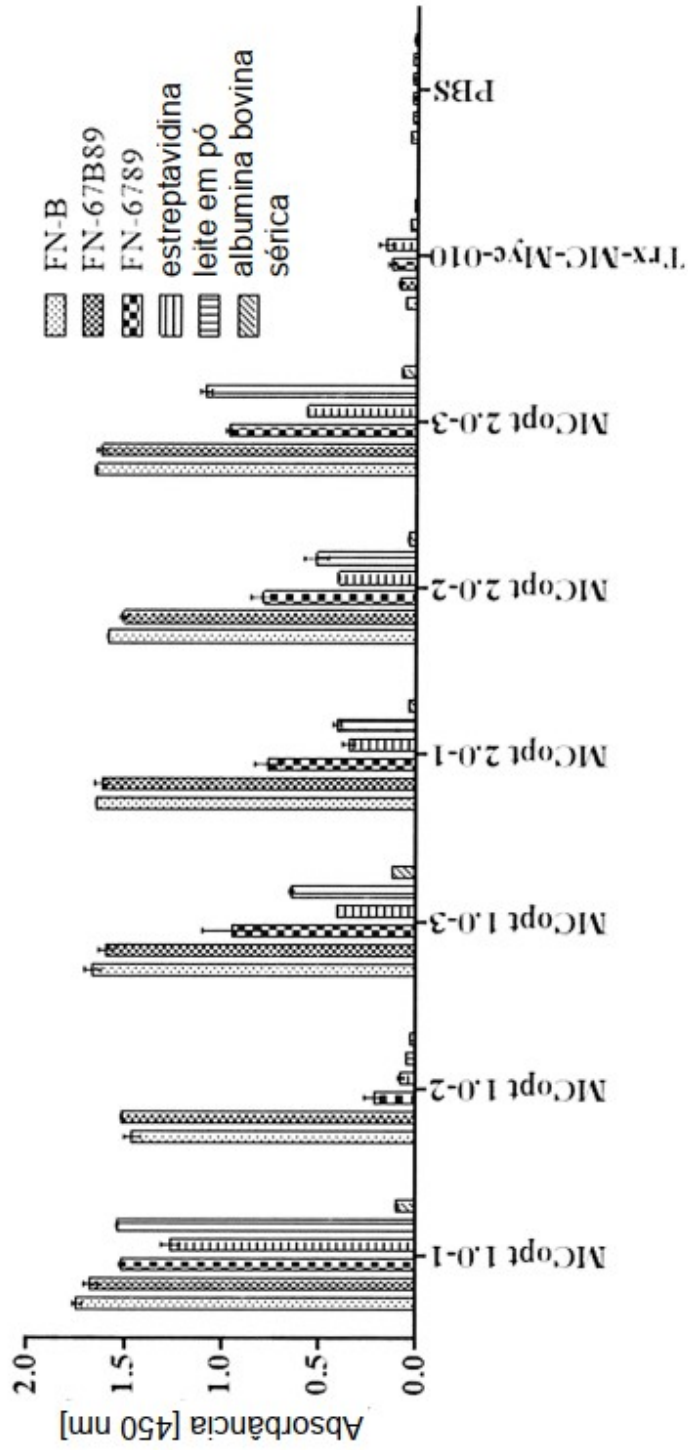


Figura 4

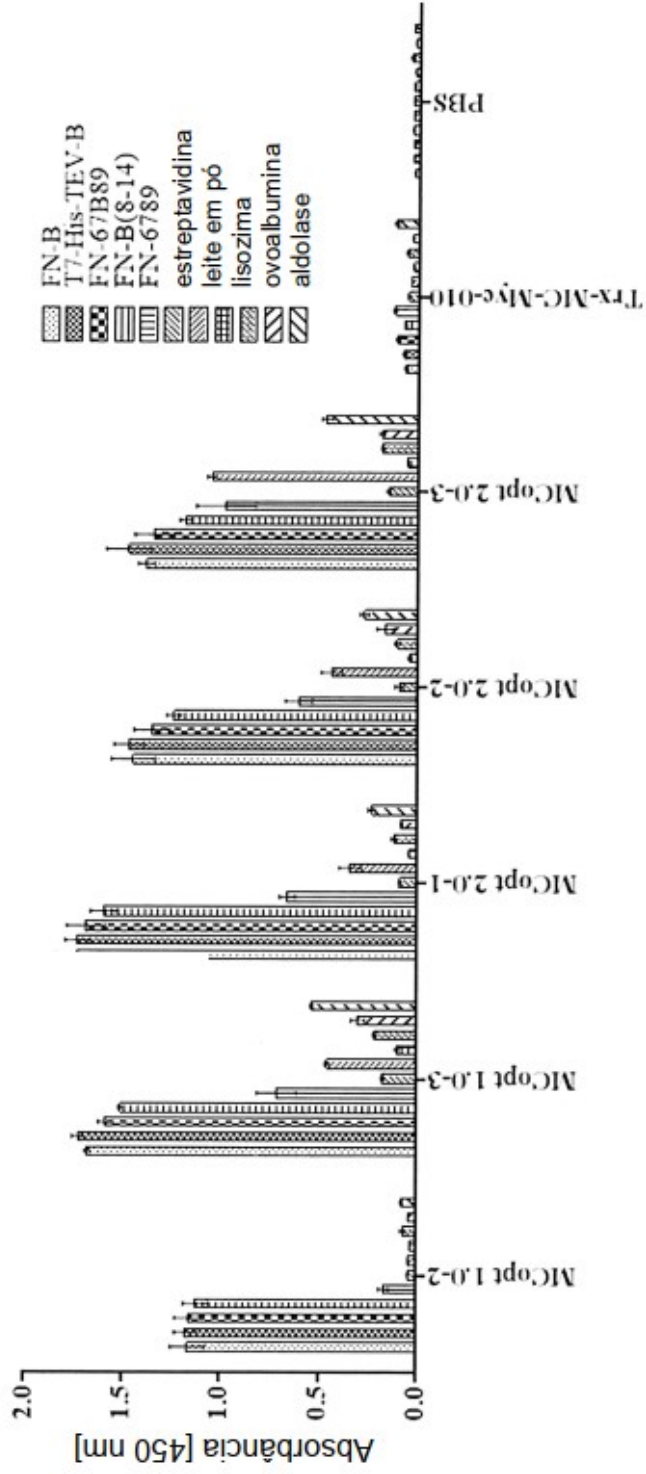


Figura 5

Figura 6

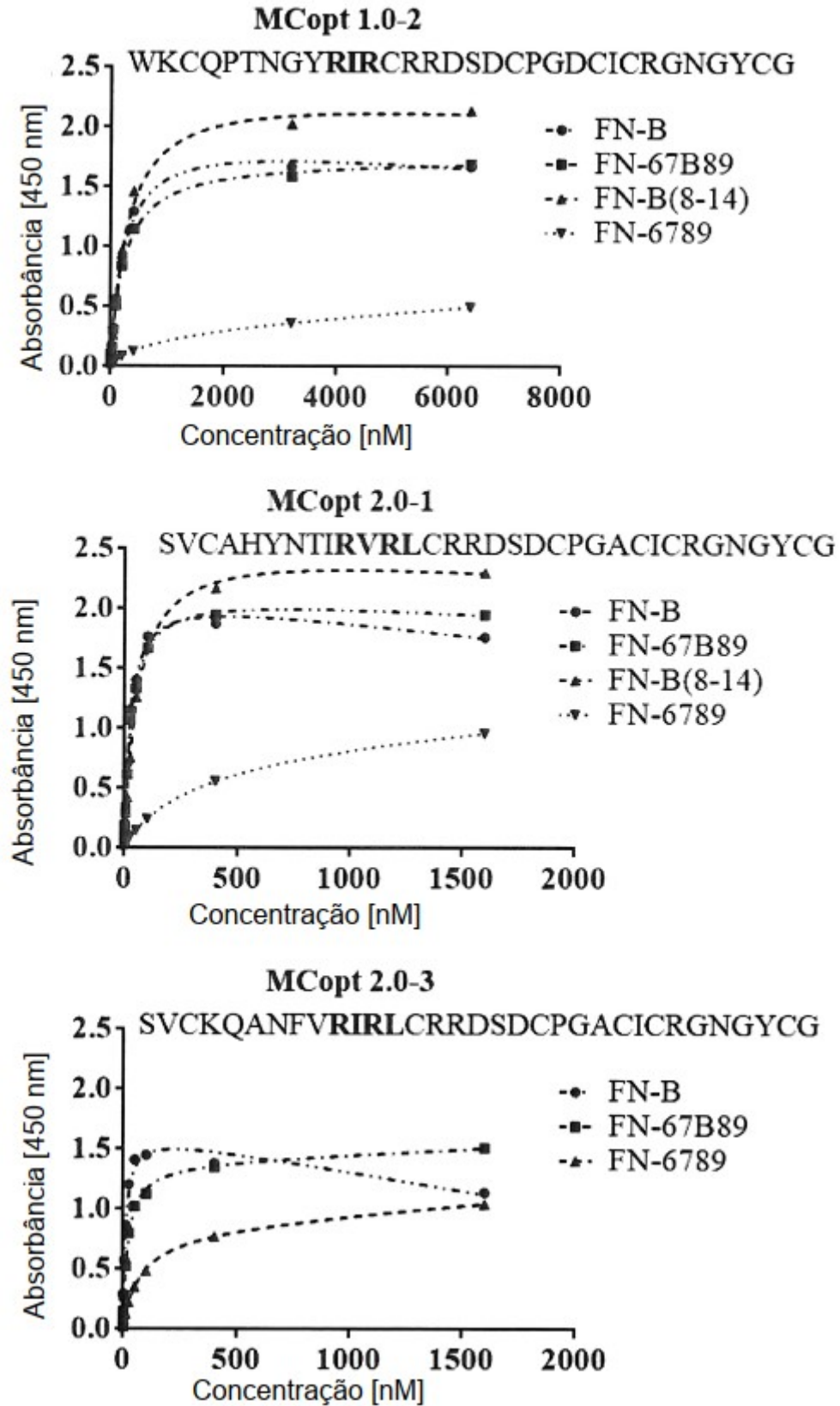


Figura 6 (continua)

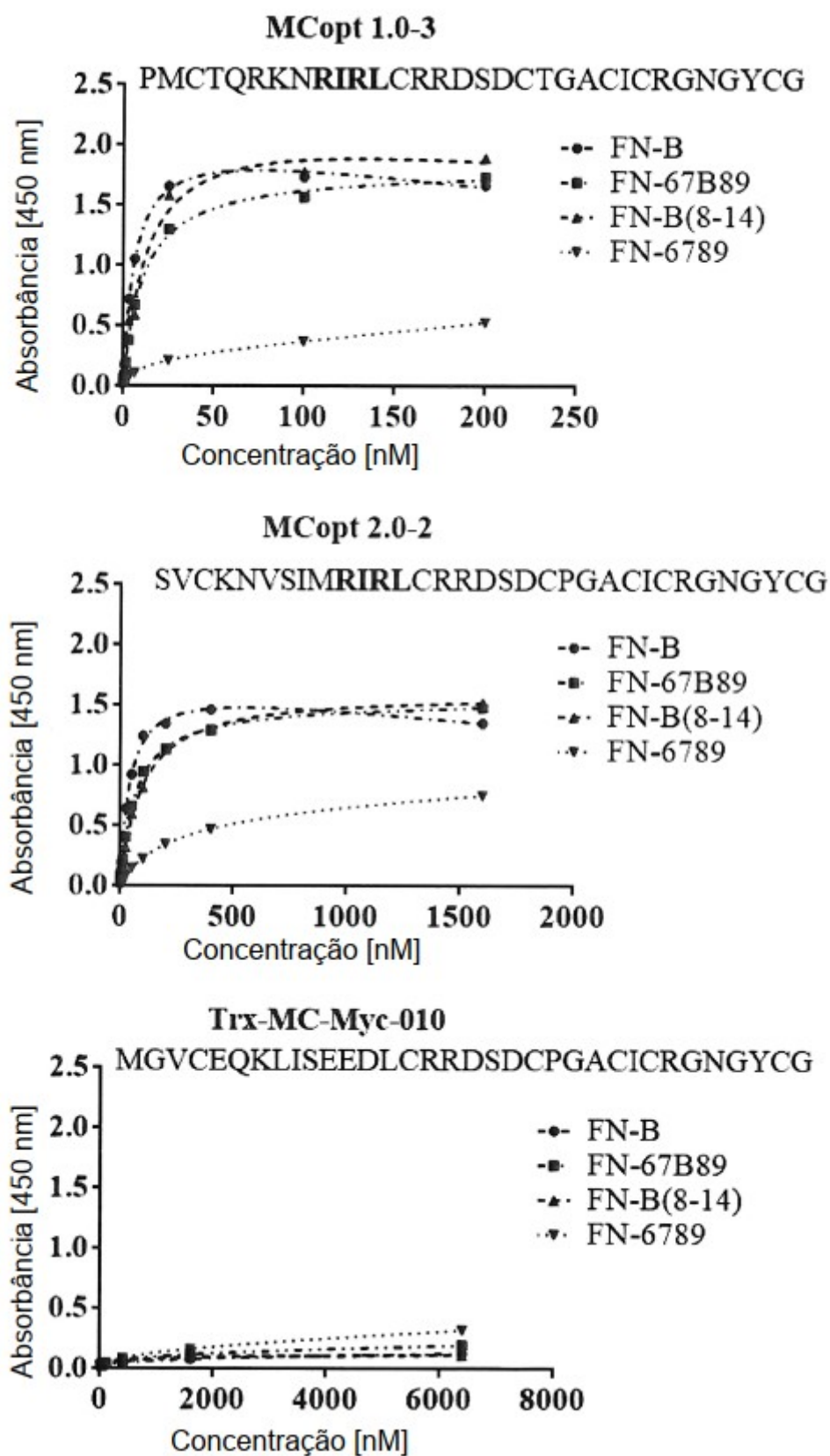


Figura 7

A

Nome do construto	Sequência de aminoácidos
MC-FN-010	PMCTQRKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-011	AMCTQRKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-012	PACTQRKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-013	PMCAQRKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-014	PMCTARKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-015	PMCTQAKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-016	PMCTQRANRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-017	PMCTQRKARIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-018	PMCTQRKNAIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-019	PMCTQRKNRARLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-0110	PMCTQRKNRIALCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-0111	PMCTQRKNRIRACRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-0112	PMCTQRKNRIRLCARDSCTGACICRGNGYCG
MC-FN-0113	PMCTQRKNRIRLCRADSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-0114	PMCTQRKNRIRLCRRDSDCTGACICAGNGYCG

B

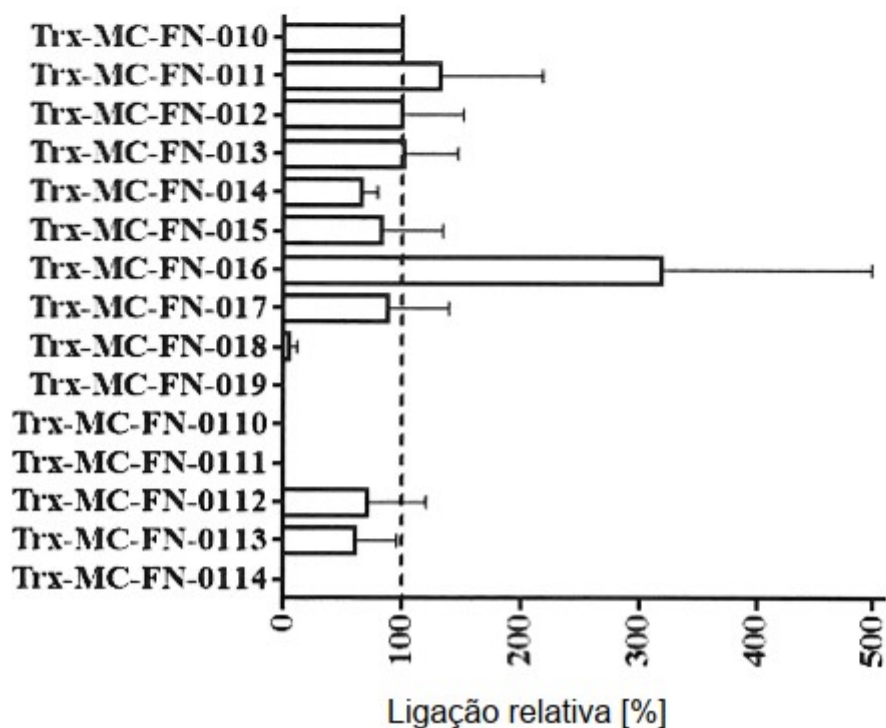


Figura 7

C



Figura 8

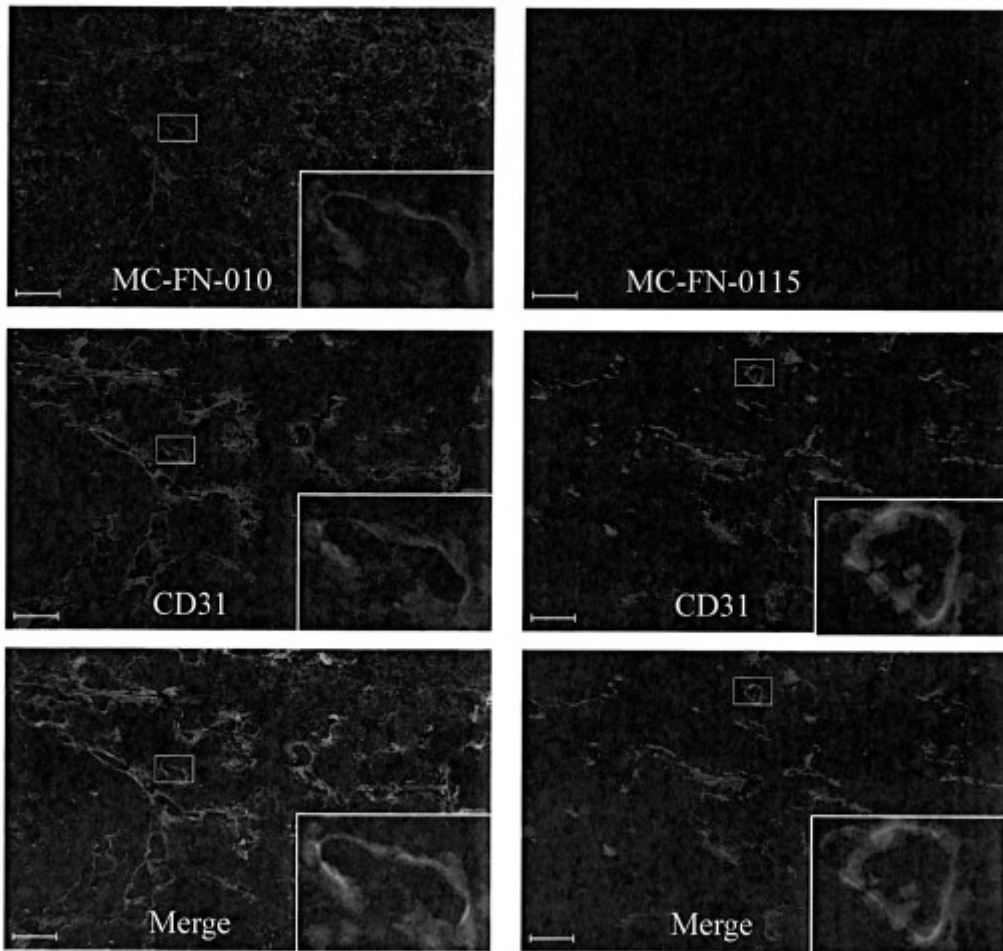


Figura 9

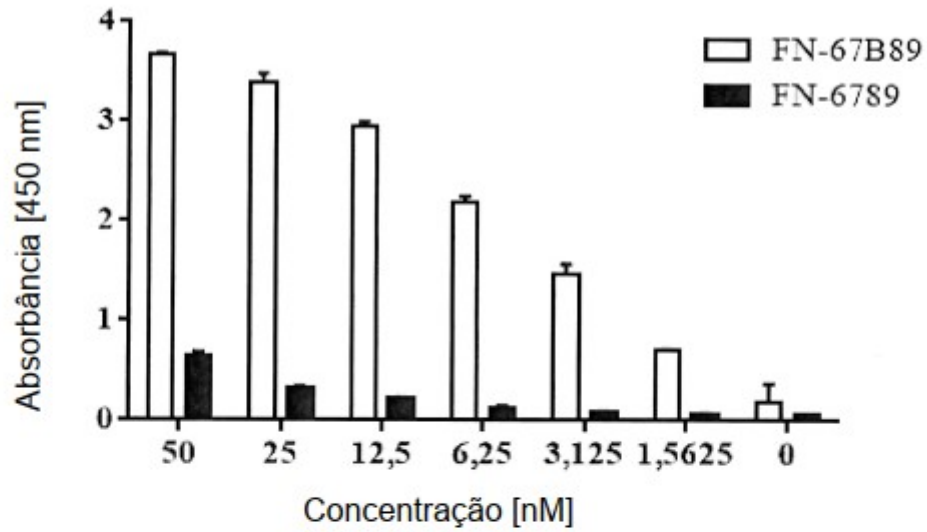
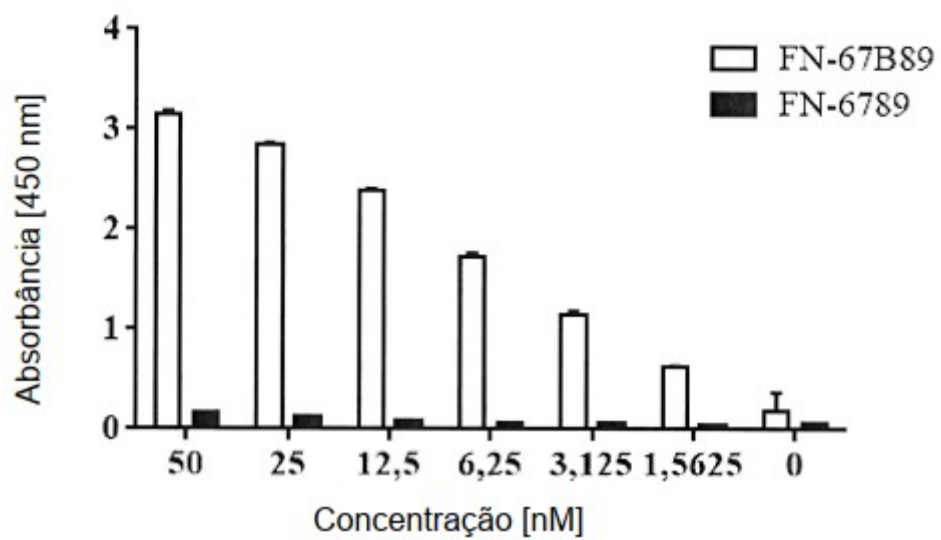
A**B**

Figura 10

A

Nome	Concentração (nM)	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	KD (μM)
MC-FN-010	50-4000	4.95x10 ⁴	0.07831	1.58
MC-FN-016	62.5-4000	1.33x10 ⁵	0.1873	1.41

B

Nome	Concentração (nM)	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	KD (pM)
AF680-(MC-FN-010)₃	1.25-10	8.04x10 ⁶	3.47x10 ⁻³	431
AF680-(MC-FN-016)₃	1.25-10	2.56x10 ⁶	2.31x10 ⁻³	902
AF680-(MC-FN-0115)₃	1.25-10	Nenhuma ligação a FN-67B89		

Figura 11

A

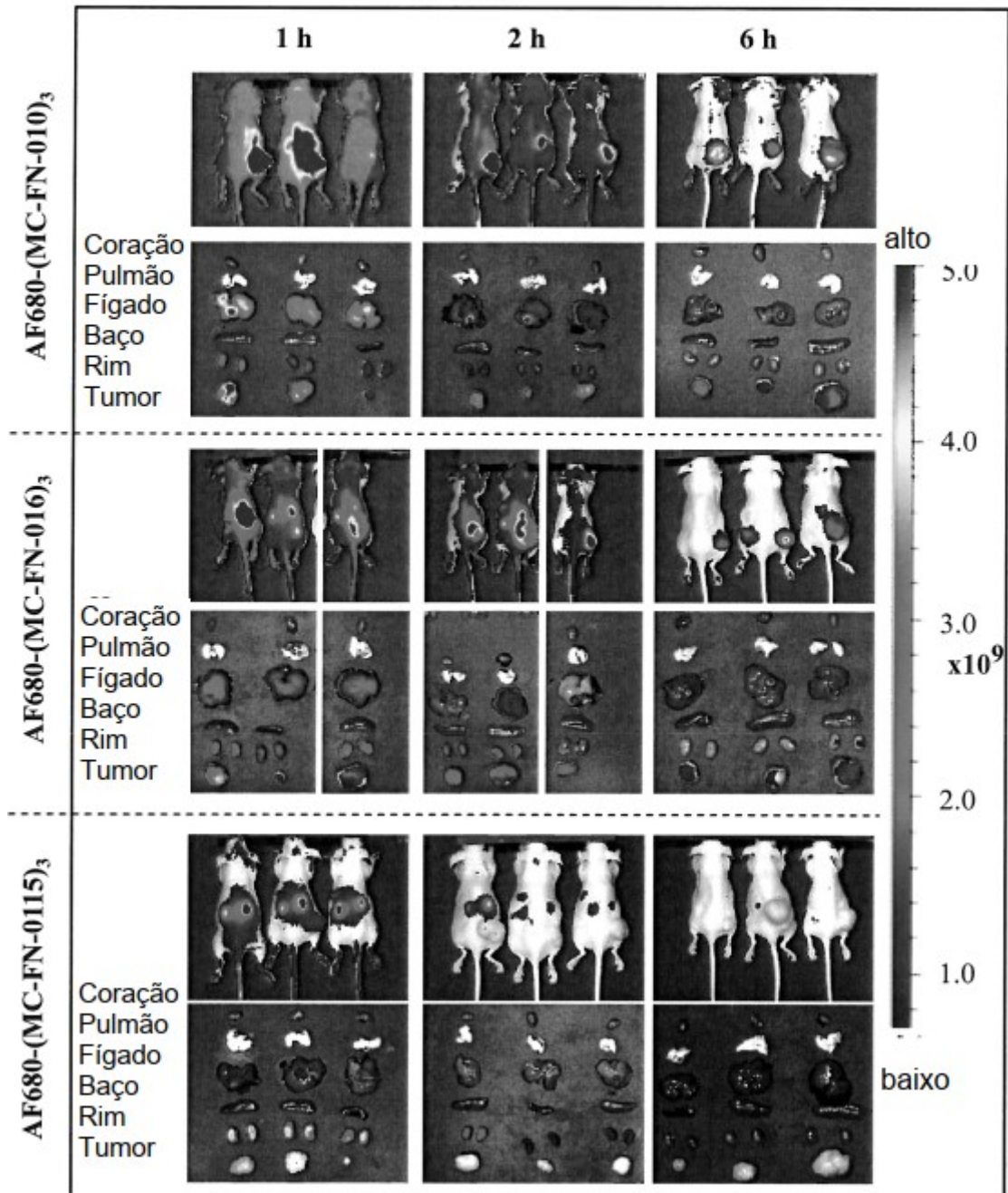


Figura 11

B

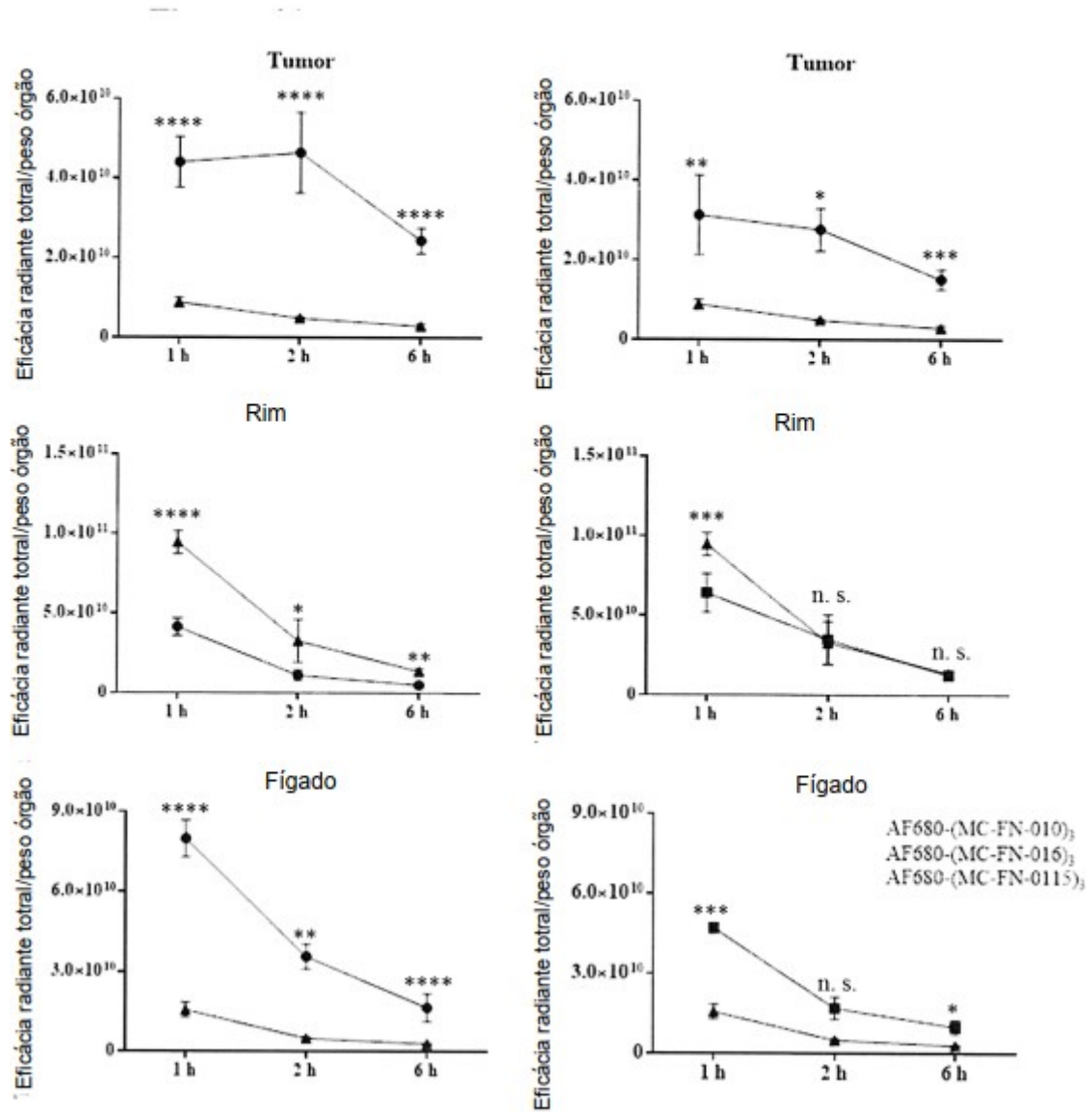


Figura 12

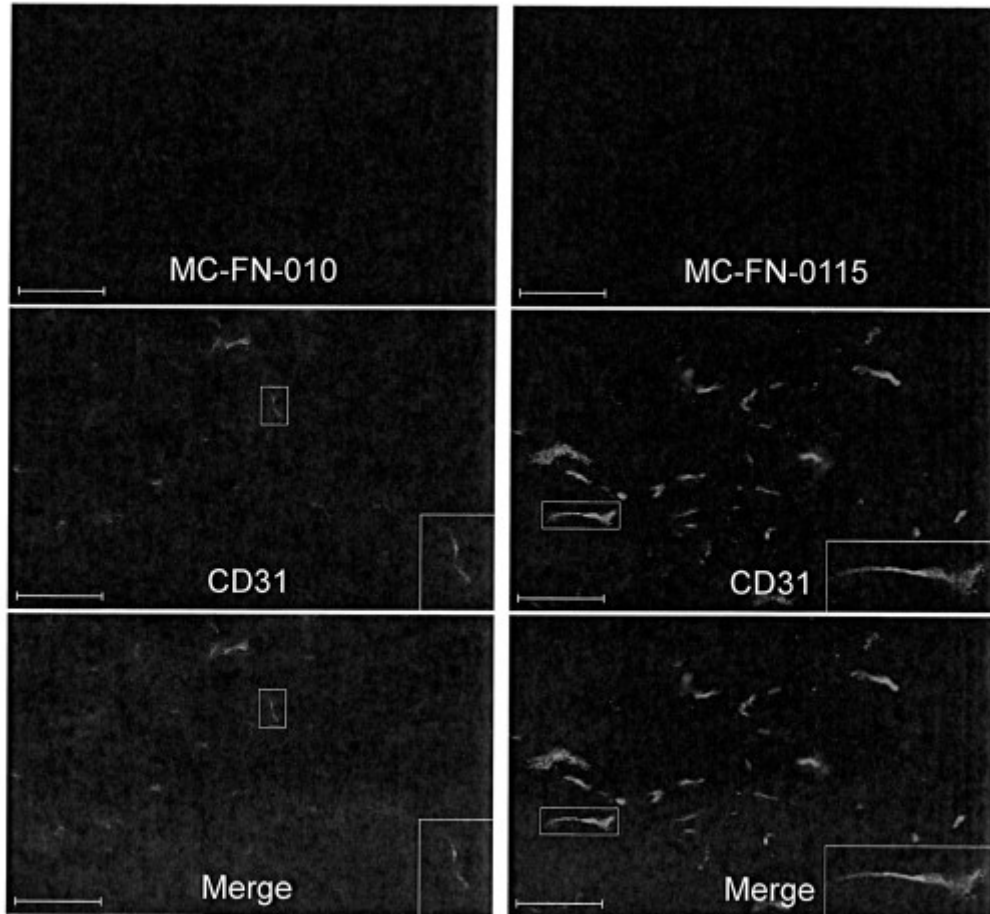


Figura 13

A

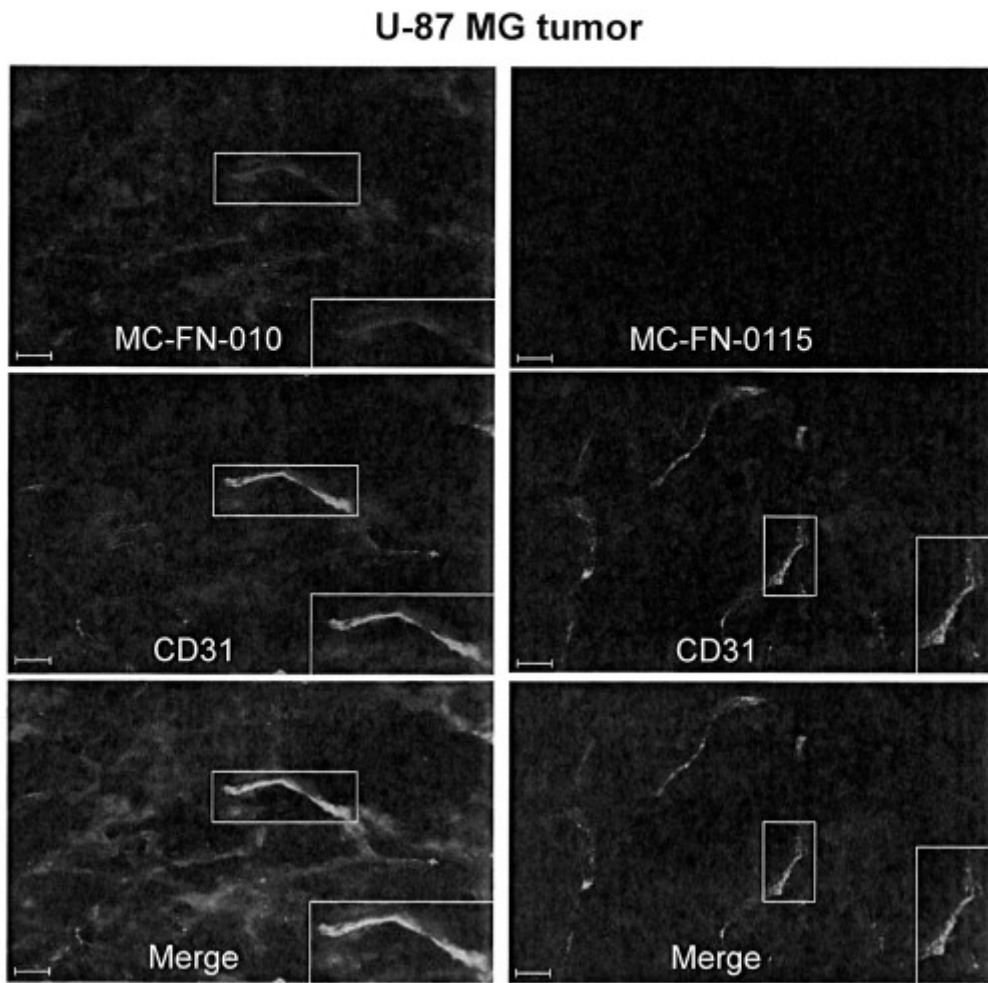


Figura 13

B

Cérebro de camundongo normal

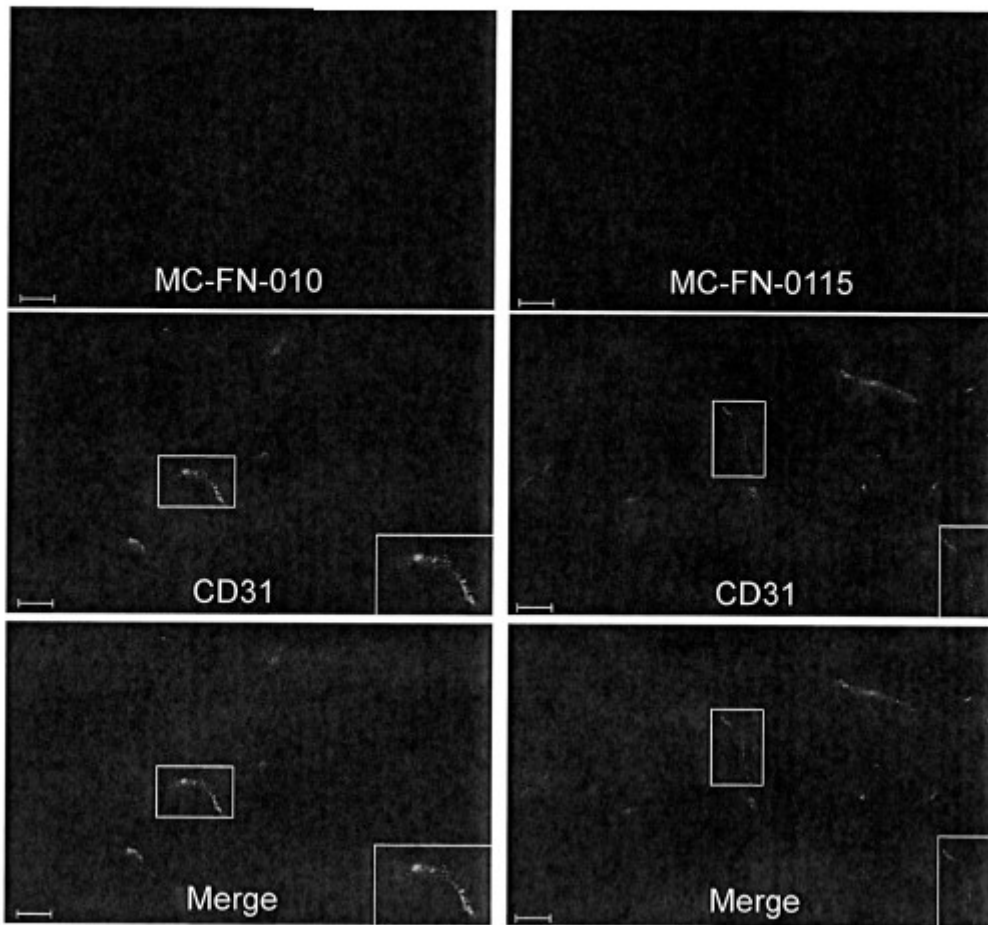


Figura 14

A

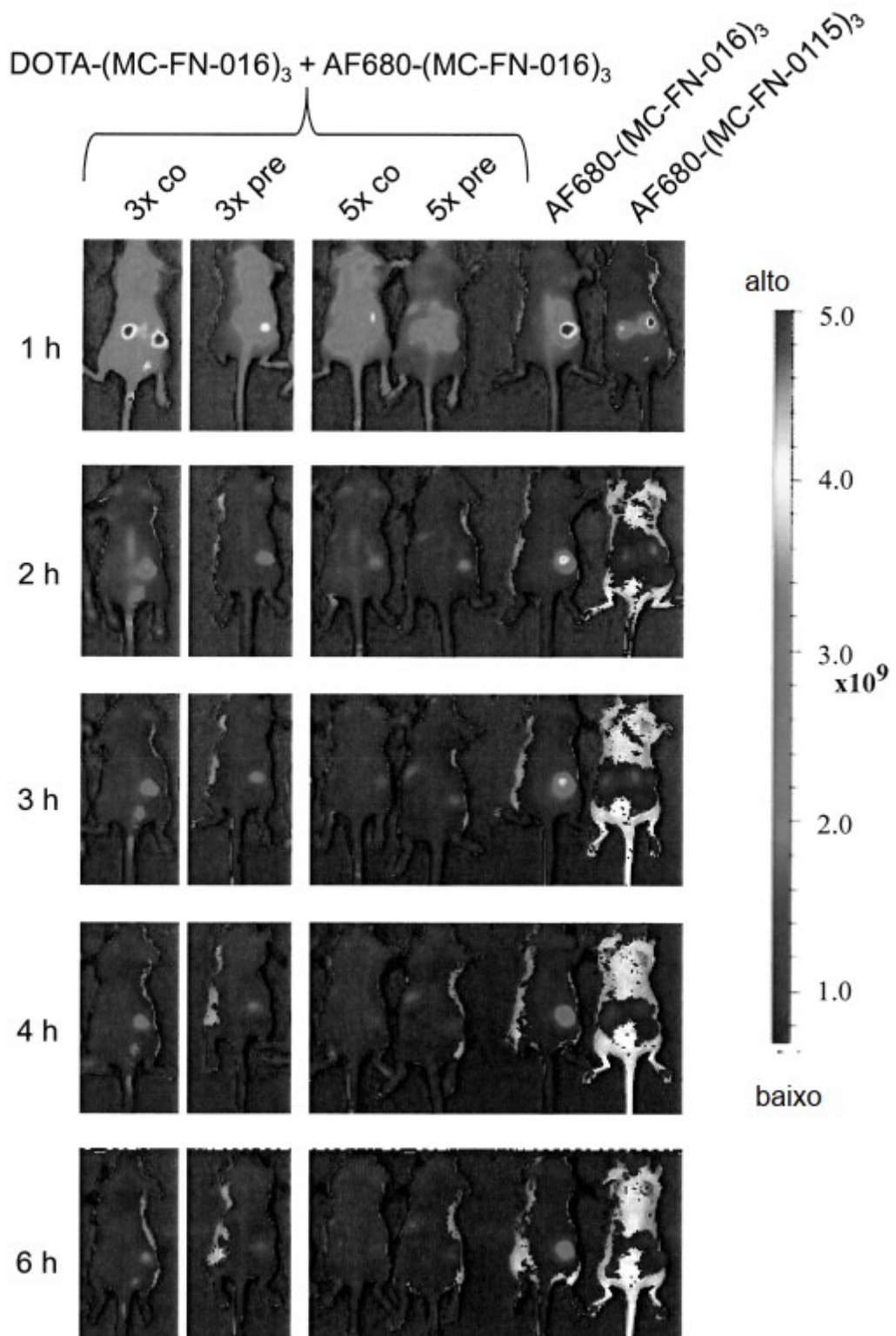


Figura 14

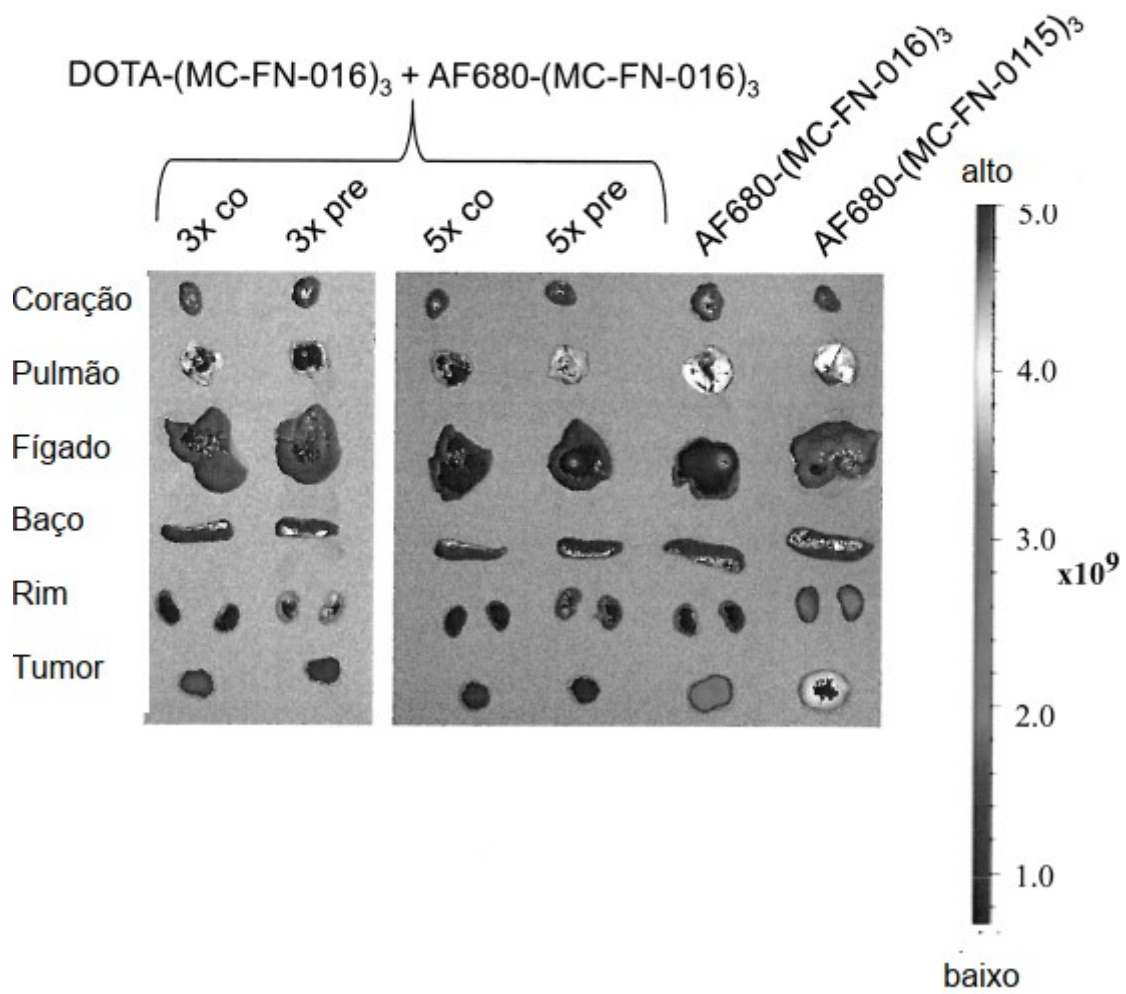
B

Figura 14

C

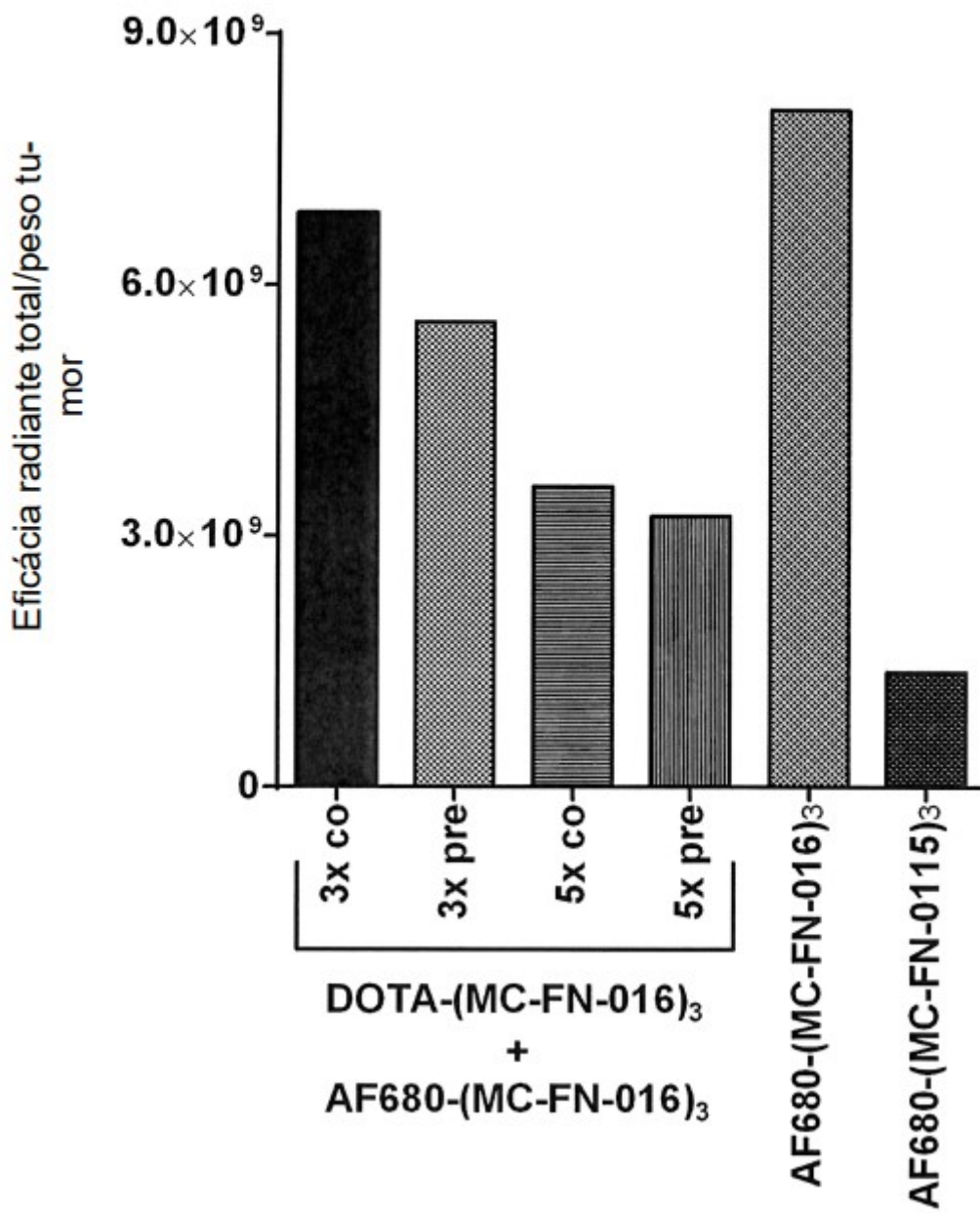


Figura 15

Nome	Faixa de concentração aplicada (nM)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (nM)
DOTA-(MC-FN-016)₃	1.25-10	3.73x10 ⁶	2.26x10 ⁻³	0.624

**“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO
E TRATAMENTO DE CÂNCER”**

RESUMO

A presente invenção se refere ao diagnóstico e tratamento de doenças que expressam o Domínio Extra B (EDB) da Fibronectina tais como doenças caracterizadas por remodelação do tecido e/ou angiogênese, em particular doenças cancerígenas, tais como câncer de cabeça e pescoço, cérebro, colorretal, pulmão, próstata e de mama. Mais particularmente, a invenção diz respeito a peptídeos que alvejam o Domínio Extra B da Fibronectina.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: PCTEP1964872-201118-LSeq-TradLin-EdP.txt
- Data de Geração do Código: 25/11/2020
- Hora de Geração do Código: 13:25:22
- Código de Controle:
 - Campo 1: DBFCF5B6EEEA4594
 - Campo 2: 9793B406ADF9361D