



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROTEÍNAS SINTÉTICAS E USOS TERAPÊUTICOS DAS MESMAS"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se a composições e métodos para o tratamento de doenças. Mais particularmente, a invenção refere-se a proteínas sintéticas e seu uso para o tratamento de câncer.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a neoplasia (por exemplo, câncer) é uma das principais causas de morte no mundo e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015. A frequência de câncer na população humana global é significativa: representando quase 1 em cada 6 mortes. Em 2015, as mortes por câncer mais comuns ocorreram pelos seguintes tipos de câncer: câncer de pulmão (cerca de 1,7 milhão de mortes), câncer de fígado (cerca de 800.000 mortes), câncer colorretal (cerca de 800.000 mortes), câncer de estômago (cerca de 800.000 mortes) e câncer de mama (cerca de 600.000 mortes).

[0003] O câncer é tipicamente tratado por qualquer um de uma variedade de métodos, tal como, por exemplo, cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia contra câncer e similares. Infelizmente, muitos desses métodos têm efeitos colaterais tóxicos / indesejáveis. Por exemplo, quimioterapias padrão para câncer foram desenvolvidas com base em sua capacidade de matar células que se dividem rapidamente, e muitas têm propriedades tóxicas que causam efeitos colaterais indesejáveis, tal como, por exemplo, imunossupressão, náusea, queda de cabelo e similares. Um objetivo central da pesquisa sobre o câncer nas últimas duas décadas tem sido identificar novas terapias com maior eficácia e menos efeitos colaterais.

[0004] Uma dessas terapias é abrangida pela imunologia do câncer, que é o estudo das interações entre o sistema imunológico e as

células cancerosas, tal como tumores ou malignidades. O início de uma resposta imune, tal como o reconhecimento de antígenos específicos para o câncer, que são expressos por tumores humanos e não expressos em tecidos normais, é de particular interesse. Geralmente, os métodos para controlar a divisão e proliferação das células malignas se concentraram no isolamento desses antígenos e na sua apresentação para que sejam reconhecidos pelo sistema imunológico como não autoantígenos para induzir uma resposta imune específica (por exemplo, vacinas contra o câncer). De modo desvantajoso, tais vacinas contra o câncer exibem uma série de limitações significativas, que surgem principalmente do método de fabricação e da potencial falta de uniformidade, atividade e homologia do produto proteico. Por exemplo, as vacinas contra o câncer geralmente compreendem uma mistura de uma proteína carreadora recombinante e polipeptídeos de origem humana que são quimicamente conjugados usando glutaraldeído. Infelizmente, este reagente reativo tem a tendência indesejável de formar ligações cruzadas covalentes entre variedades de grupos químicos, e geralmente leva a um produto altamente heterogêneo. Assim, as vacinas resultantes podem compreender não apenas moléculas de proteína carreadora com números variáveis do polipeptídeo humano alvo anexado (por exemplo, 0, 1, 2, 3, etc.), mas os polipeptídeos humanos podem ser ligados ao veículo através de átomos diferentes e, portanto, podem estar presente em diferentes posições e em diferentes orientações. Além disso, tanto as moléculas alvo do polipeptídeo quanto da proteína carreadora podem ser conjugadas entre si, resultando em vários homo-multímeros que podem não ter eficácia clínica e podem não contribuir para uma resposta imune do paciente anticâncer. Consequentemente, há uma necessidade urgente de novas vacinas contra o câncer que superem essas limitações significativas existentes no campo da imunoterapia contra o câncer.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0005] A presente descrição é direcionada a proteínas / moléculas sintéticas e seus respectivos métodos de fabricação; a caracterização das proteínas / moléculas sintéticas e métodos terapêuticos de utilização das proteínas / moléculas sintéticas para tratar doenças crônicas, tal como, por exemplo, câncer de pulmão, mama, bexiga, próstata, ovário, vulva, cólon, colorretal, intestinal, pulmonar, cerebral esofágico, outros tipos de câncer, e outras doenças.

[0006] A presente descrição fornece proteínas sintéticas que podem ser usadas como modalidades terapêuticas para tratar doenças tal como, por exemplo, câncer. Em uma modalidade ilustrativa, a presente descrição fornece uma proteína / molécula sintética que inclui um ou mais domínios proteicos de um fator de crescimento sintético, uma ou mais regiões ligantes, e um ou mais domínios imunogênicos.

[0007] Em um aspecto, a presente descrição fornece uma proteína sintética que inclui uma sequência de fator de crescimento sintético; pelo menos um ligante, e uma sequência polipeptídica.

[0008] Em uma modalidade ilustrativa, a sequência polipeptídica inclui uma sequência polipeptídica imunogênica. Em uma modalidade ilustrativa, a sequência polipeptídica inclui uma proteína da toxina B da cólera (CT-B).

[0009] Em uma modalidade ilustrativa, pelo menos um ligante inclui um primeiro ligante que separa o fator de crescimento sintético da sequência polipeptídica. Em uma modalidade ilustrativa, o primeiro ligante é selecionado a partir do grupo que consiste de SSG, GSSG, SSSGG, SGG, GGSGG, GGGGS, SSSGGSSG, SSSGGSSGG, TSSGGSG, TSSGGSSG, SSSGGSSGSSG, GSSGGTSSGGSSG, SGGTSSGGSSGG, GSSGGTSSGGSSGG, SSSGGSSGGSSG, SSSGGSSGGSSGG, e SSSGGSSGGSSGGSSGG. Em uma modalidade ilustrativa, o primeiro ligante é GSSGGTSSGGSSGG.

[0010] Em uma modalidade ilustrativa, a sequência do fator de crescimento sintético inclui uma sequência do fator de crescimento epidérmico sintético (sEGF). Em uma modalidade ilustrativa, a sequência do fator de crescimento sintético inclui pelo menos um domínio da via de sinalização direcionada sintética (sTSP) de um domínio TSP (hEGF) do fator de crescimento epidérmico humano (hEGF) no qual pelo menos um sTSP difere do hTSP em 6, 7, 8, 9, 10 ou mais aminoácidos. Em uma modalidade ilustrativa, a sequência do fator de crescimento sintético inclui um primeiro domínio TSP e um segundo domínio TSP.

[0011] Em uma modalidade ilustrativa, pelo menos um ligante inclui um segundo ligante que separa o primeiro domínio TSP e o segundo domínio TSP. Em uma modalidade ilustrativa, o segundo ligante é selecionado a partir do grupo que consiste de SSG, GSSG, SSGGG, SGG, GGSGG, GGGGS, SSGGGSGG, SSGGGGSGGG, TSGGGSG, TSGGGGSGG, SSGGGSGGSSG, GGSGGTSGGGSG, SGGTSGGGG SGG, GGSGGTSGGGGSGG, SSGGGGSGGGSSG, SSGGGSGGSSG GG, e SSGGGGSGGGSSGGG. Em uma modalidade ilustrativa, o segundo ligante é GSSG. Em uma modalidade ilustrativa, a proteína sintética tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade ilustrativa, a proteína sintética é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 1.

[0012] Em uma modalidade ilustrativa, uma porção do fator de crescimento sintético inclui um domínio completo ou neutralizante de pelo menos dois fatores de crescimento diferentes presentes na dita proteína sintética.

[0013] Em um aspecto, a presente descrição fornece uma composição imunogênica, compreendendo uma proteína sintética que inclui uma sequência de fator de crescimento sintético, pelo menos um ligante, e uma sequência de polipeptídeo.

[0014] Em uma modalidade ilustrativa, a sequência polipeptídica inclui uma sequência polipeptídica imunogênica. Em uma modalidade ilustrativa, a sequência polipeptídica inclui uma proteína da toxina B da cólera (CT-B).

[0015] Em uma modalidade ilustrativa, pelo menos um ligante inclui um primeiro ligante que separa o fator de crescimento sintético da sequência polipeptídica. Em uma modalidade ilustrativa, o primeiro ligante é selecionado a partir do grupo que consiste de SSG, GSSG, SSGGG, SGG, GGSSG, GGGGS, SSGGGSSG, SSGGGSSGG, TS GGGSG, TSGGGSSG, SSGGGSSGSSG, GGSSGTSSGGSG, SG GTSSGGSSG, GGSSGTSSGGSSG, SSGGGSSGGSSG, SSG GGSSSSGG, e SSGGGSSGGSSGG. Em uma modalidade ilustrativa, o primeiro ligante é GGSSGTSSGGSSG.

[0016] Em uma modalidade ilustrativa, a sequência do fator de crescimento sintético inclui uma sequência do fator de crescimento epidérmico sintético (sEGF). Em uma modalidade ilustrativa, a sequência do fator de crescimento sintético inclui pelo menos um domínio da via de sinalização direcionada sintética (sTSP) de um domínio TSP (hEGF) do fator de crescimento epidérmico humano (hEGF) no qual pelo menos um sTSP difere do hTSP em 6, 7, 8, 9, 10 ou mais aminoácidos. Em uma modalidade ilustrativa, a sequência do fator de crescimento sintético inclui um primeiro domínio TSP e um segundo domínio TSP.

[0017] Em uma modalidade ilustrativa, pelo menos um ligante inclui um segundo ligante que separa o primeiro domínio TSP e o segundo domínio TSP. Em uma modalidade ilustrativa, o segundo ligante é selecionado a partir do grupo que consiste de SSG, GSSG, SSGGG, SGG, GGSSG, GGGGS, SSGGGSSG, SSGGGSSGG, TSGGGSG, TSGGGSSG, SSGGGSSGSSG, GGSSGTSSGGSG, SGGTSSGG GSSG, GGSSGTSSGGSSG, SSGGGSSGGSSG, SSGGGSSG

SSGGG, e SSGGGGSSGGSSGGG. Em uma modalidade ilustrativa, o segundo ligante é GSSG. Em uma modalidade ilustrativa, a proteína sintética tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0018] Em uma modalidade ilustrativa, a proteína sintética é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 1.

[0019] Em uma modalidade ilustrativa, uma porção do fator de crescimento sintético inclui um domínio completo ou neutralizante de pelo menos dois fatores de crescimento diferentes presentes na dita proteína sintética. Em uma modalidade ilustrativa, a composição compreende ainda um adjuvante.

[0020] Em um aspecto, a presente descrição fornece um método para tratar um paciente que inclui as etapas de administrar ao paciente uma composição imunogênica que inclui uma proteína sintética com uma sequência de fator de crescimento sintético, pelo menos um ligante, e uma sequência polipeptídica no mesmo dia ou em dias ou horários alternados durante um período de vacinação.

### Definições

[0021] Por "molécula de ácido nucleico BVN22E" entende-se um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo BVN22E. Uma molécula de ácido nucleico BVN22E exemplificativa é reproduzida abaixo (SEQ ID NO: 1):

>BVN22E

```
AATACCGAAAACGATTGCCCTCTGTCTCATGAAGCGTATTGTCTGCACGACGGCGTGTGT
ATGTACATTGAAGCCCTGGACAAATATGCATGTAAGTGTGTCTCGTGGGCTACGTGGGGGAG
CGATGTCAGTTTCGAGACCTGCGTTGGTGGGATGCGCGCGGCTCGAGCGGTAATACCGAA
AACGATTGCCCTCTGTCTCATGAAGCGTATTGTCTGCACGACGGCGTGTGTATGTACATT
GAAGCCCTGGACAAATATGCATGTAAGTGTGTCTCGTGGGCTACGTGGGGGAGCGATGTCAG
TTTCGAGACCTGCGTTGGTGGGATGCGCGCGGCGGGTCTGGAGGTAAGTGGCGGCGGT
GGAGGGTTCGGGTACCCCGCAGAACATCACCGACCTGTGCGCCGAGTACCACAACACCCAG
ATCCACACCCTGAACGACAAGATCTTCTCGTACACCGAGAGCCTGGCCGATAAGCGTGAA
ATGGCCATCATCACCTTCAAGAACGGTTCGACCTTCCAGGTGGAGGTCCCGGGTAGCCAG
CACATCGATTACAGAAGAAGGCCATCGAGCGTATGAAGGACACCCTGCGTATCGCCTAC
```

CTGACCGAAGCCAAGGTGGAAAAGCTGTGCGTCTGGAACAACAAGACGCCGCACGCCATC  
GCCGCCATCAGCATGGCCAAT

[0022] Por "polipeptídeo BVN22E" entende-se um polipeptídeo ou seu fragmento tendo pelo menos cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de aminoácidos (excluindo as seguintes alterações de aminoácidos: T2S, E3D, N4S, D5E, E11D, A12G, V38I, F44Y, R48K, D51E e A52L) com a sequência de aminoácidos abaixo (SEQ ID NO: 2):

>BVN22E

NTENDCPLSHEAYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YVGERCQFRDLRWW DARGSSGNTE  
NDCPLSHEAYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YVGERCQFRDLRWW DARGGSGGTSGGG  
GGSGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLADKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQ  
HIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN

[0023] Por "molécula de ácido nucleico do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)" entende-se um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de EGFR. Uma molécula de ácido nucleico EGFR exemplificativa é fornecida no No.de Acesso NCBI NM\_005228.4 e reproduzida abaixo (SEQ ID NO: 3):

>NM\_005228.4

gtccgggagcccccggcgcagcgcggccgcagcagcctccgcccccgccacggtgtgag  
cgcccgcagcggccgagggcggccggagtcgagctagccccggcggccgcccgcgccccca  
gaccggagcagcagggccacctcgtcggcgtccgcccagtcgccccgctcgcgccaacgcc  
acaaccaccgcgcacggccccctgactccgtccagtcattgatcgggagagccggagcgcgag  
ctcttcggggagcagcgcgatgacccctccgggacggccggggcagcgcctcctggcgcctgc  
tggctgcgctctgcccggcgcagtcgggctctggaggaaaagaaagtttgccaaggcacga  
gtaacaagctcacgcagttgggcacttttgaagatcattttctcagcctccagaggatgt  
tcaataactgtgaggtggccttgggaatttggaaattacctatgtgcagaggaattatg  
atctttccttcttaagaccatccagggaggtggctggttatgtcctcattgccctcaaca  
cagtgaggcgaattcctttggaaaacctgcagatcatcagaggaaatatgtactacgaaa  
attcctatgccttagcagtccttatctaactatgatgcaaataaaaccggactgaaggagc  
tgcccatgagaaatttacaggaaatcctgcatggcgcgctgcggttcagcaacaacctg  
ccctgtgcaacgtggagagcatccagtgggcgggacatagtcagcagtgactttctcagca  
acatgtcgcagtgacttccagaaccacctgggcagctgccccaaagtgtgatccaagctgtc  
ccaatgggagctgctgggggtgcaggagaggagaactgccagaaactgaccaaataatcatct

gtgcccagcagtgctccgggctgcccgtggcaagtccccagtgactgctgccacaacc  
agtgtgctgcaggctgcacaggccccgggagagcgactgctggtctgcccgaattcc  
gagacgaagccacgtgcaaggacacctgccccactcatgctctacaaccccaccacgt  
accagatggatgtgaaccccgagggcaatacagctttggtgccacctgctgaagaagt  
gtccccgtaattatgtggtgacagatcacggctcgtgctccgagcctgtggggccgaca  
gctatgagatggaggaagacggcgtccgcaagtgtaagaagtgcgaagggccttgccga  
aagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaaagactcactctccataaatgctacga  
atattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggggatctccacatcctgccggtgg  
catttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattc  
tgaaaaccgtaaaggaaatcacagggtttttctgctgattcaggcttggcctgaaaacagga  
cggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggctc  
agttttctcttgacgtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaagg  
agataagtgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatttgctgctatgcaatacaa  
taaactggaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaacccaaaattataagcaacagag  
gtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgctgctccccgagggct  
gctggggcccggagcccaggactgctctcttgccggaatgtcagccgaggcagggaat  
gcgtggacaagtgaaccttctggagggtgagccaagggagtttggtggagaactctgagt  
gatacagtgccaccagagtgctgctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggg  
gaccagacaactgtatccagtggtgccactacattgacggccccactgctcaagacct  
gcccggcaggagtcatgggagaaaacaacacctggtctggaagtacgcagacgcccggcc  
atgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggcccaggtcttgaag  
gctgtccaacgaatgggacctaaagatcccgctccatgccactgggatgggtggggccctcc  
tcttgctgctggtggtggccctggggatcggcctcttcatgcaaggcgcacatcgttc  
ggaagcgcacgtgctgagggctgctgcaggagagggagcttggtggagcctcttacacca  
gtggagaagctcccaaccaagctctcttgaggatcttgaaggaaactgaattcaaaaaga  
tcaaagtgtgggctccggtgcggttcggcacgggtgtataagggactctggatcccagaag  
gtgagaaagttaaaattcccgtcgtatcaaggaattaagagaagcaacatctccgaaag  
ccaacaaggaaatcctcgatgaagcctacgtgatggccagcgtggacaacccccacgtgt  
gccgctgctgggcatctgcctcacctccaccgtgcagctcatcacgcagctcatgcct  
tcggctgctcctggactatgtccgggaacacaaagacaatattggctcccagtacctgc  
tcaactggtgtgtgcagatcgcaaagggcatgaactacttgaggaccgtcgcttgggtgc  
accgcgacctggcagccaggaacgtactggtgaaaacaccgcagcatgtcaagatcacag  
atthtgggctggccaaactgctgggtgcggaagagagaataacatgcagaaggaggca  
aagtgcctatcaagtggatggcattggaatcaattttacacagaatctatacccaccaga  
gtgatgtctggagctacgggtgactgthtgggagttgatgaccttggatccaagccat  
atgacggaatccctgccagcgagatctcctccatcctggagaaaggagaacgcctccctc  
agccacccatattgtaccatcgatgtctacatgatcatggccaagtgtggatgatagacg

cagatagtcgccccaaagtccggtgagttgatcatcgaattctccaaaatggcccagagacc  
cccagcgctaccttgctcattcaggggatgaaagaatgcatttgccaagtcctacagact  
ccaacttctaccgtgccctgatggatgaagaagacatggacgacgtggtggatgccgacg  
agtacctcatcccacagcagggcttcttcagcagcccctccacgtcacggactcccctcc  
tgagctctctgagtgcaaccagcaacaattccaccgtggcttgattgatagaaatgggc  
tgcaaagctgtcccacaaagagacagcttcttcagcagatacagctcagacccccacag  
gctgcttgactgaggacagcatagacgacaccttctcccagtgctgaatacataaacc  
agtccgttccaaaaggcccgtggctctgtgcagaatcctgtctatcacaatcagcctc  
tgaaccccgcgcccagcagagacccacactaccaggacccccacagcactgcagtgggca  
accccagatctcaacactgtccagcccacctgtgtcaacagcacattcgacagccctg  
cccactgggcccagaaaggcagccaccaaatagcctggacaaccctgactaccagcagg  
acttctttccaaggaagccaagccaaatggcatctttaagggtccacagctgaaaatg  
cagaatacctaagggctcgcgccacaaagcagtgaaatatttgagcatgaccacggagga  
tagtatgagccctaaaaatccagactctttcgatacccaggaccaagccacagcaggtcc  
tccatcccaacagccatgcccgcattagctcttagacccacagactgggttttgcaacgtt  
tacaccgactagccaggaagtaacttccacctcgggcacattttggaagttgcattcctt  
tgtcttcaaactgtgaagcatttacagaaacgcacccagcaagaatattgtcccttgag  
cagaaatttatctttcaaagaggtatatttgaaaaaaaaaaaaaagtatatgtgaggat  
ttattgattggggatcttgaggttttctattgtcgtctattgatttttacttcaatgggct  
cttccaacaaggaagaagcttgctggttagcacttgctaccctgagttcatccaggcccaa  
ctgtgagcaaggagcacaagccacaagtcttccagaggatgcttgattccagtggttctg  
cttcaaggcttccactgcaaaacactaaagatccaagaaggccttcatggcccagcagg  
ccggatcggactgtatcaagtcattggcaggtacagtaggataagccactctgtcccttc  
ctgggcaagaagaaacggaggggatggaattcttcttagacttacttttgtaaaaatg  
tccccacggtacttactccccactgatggaccagtggtttccagtcattgagcgttagact  
gacttggttcttccattccattggtttgaaactcagtatgctgcccctgtcttgctgt  
catgaaatcagcaagagaggatgacacatcaaataaactcggattccagcccacattg  
gattcatcagcatttgaccaatagcccacagctgagaatgtggaatacctaaggatagc  
accgcttttgctctcgcaaaaacgtatctcctaatttgaggctcagatgaaatgcatcag  
gtcctttggggcatagatcagaagactacaaaaatgaagctgctctgaaatctcctttag  
ccatcaccccaacccccaaaattagtttggttacttatggaagatagttttctccttt  
tacttcaacttcaaagctttttactcaaagagtatatgttccctccaggctcagctgcccc  
caaaccccctccttacgctttgtcacacaaaaagtgctctctgccttgagtcatttca  
agcacttacagctctggccacaacagggcattttacaggtgcgaatgacagtagcattat  
gagtagtggtgaattcaggtagtaaatatgaaactagggtttgaaattgataatgctttc  
acaacatttgagatgttttagaaggaaaaagttccttccctaaaataatttctctacaa  
ttggaagattggaagattcagctagttaggagcccacctttttcctaactctgtgtgtgc

cctgtaacctgactggtaacagcagtcctttgtaaacagtgttttaactctcctagtc  
aatatccaccccatccaatttatcaaggaagaaatggttcagaaaatattttcagcctac  
agttatgttcagtcacacacacatacaaaatgttccttttgcttttaagtaatttttga  
ctcccagatcagtcagagcccctacagcattgttaagaaagtatttgatttttgtctcaa  
tgaaaataaaactatattcatttccactctattatgctctcaaatacccctaagcatcta  
tactagcctgggtatgggtatgaaagatacaaagataaataaaacatagtccttgattcta  
agaaattcacaatttagcaaaggaaatggactcatagatgctaaccttaaaacaacgtga  
caaatgccagacaggaccatcagccaggcactgtgagagcacagagcagggaggtggg  
tcctgcctgaggagacctggaagggaggcctcacaggaggatgaccaggtctcagtcagc  
ggggaggtggaagtgacaggtgcatcaggggcaccctgaccgaggaaacagctgccagag  
gcctccactgctaaagtcacataaggctgaggtcagtcaccctaacaacctgctcct  
ctaagccaggggatgagcttgagcatcccacaagttccctaaaagttgcagccccagg  
gggattttgagctatcatctctgcacatgcttagtgagaagactacacaacatttctaag  
aatctgagattttatattgtcagttaaccactttcattattcattcacctcaggacatgc  
agaaatatttcagtcagaactgggaaacagaaggacctacattctgctgtcacttatgtg  
tcaagaagcagatgatcgatgaggcaggtcagttgtaagtgagtcacattgtagcattaa  
attctagtatTTTTGTAGTTTgaaacagtaacttaataaaagagcaaaagctaaaaaaaa  
aaaaaaaa

[0024] Por "polipeptídeo de receptor de fator de crescimento epi-  
dérmico (EGFR)" entende-se um polipeptídeo ou fragmento do mesmo  
com pelo menos cerca de 85% de identidade de aminoácidos com o  
No. de acesso NCBI NP\_005219.2 e tendo atividade de ligação ao fa-  
tor de crescimento epidérmico (EGF), conforme reproduzido abaixo  
(SEQ ID NO: 4):

> NP\_005219.2

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEV  
VLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNLQIIRGNMYYENSYALA  
VLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDF  
QNLHGSCQKCDPSPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRRCRGKSPSDCCHNQCAAGC  
TGPRESDECLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYV  
VTDHGSCVRACGADSYEMEE DGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFK  
NCTSI SGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAF  
ENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKL  
FGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCN  
LLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM

GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNPKI PSIATGMV GALLLLLVV  
 ALGIGLFMRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKIKV LGS  
 GAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRL LGI  
 CLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLED RRLVHRDLAA  
 RNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSY  
 GVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPK  
 FRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVDADEYLIPQ  
 QGFSSPSTSRTPLLSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTED  
 SIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLN  
 TVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRV  
 APQSSEFIGA

[0025] Por "molécula de ácido nucleico do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)", entende-se um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de EGF. Uma molécula de ácido nucleico de EGF exemplificativa é fornecida no No. de Acesso NCBI NM\_001963.5 e reproduzida abaixo (SEQ ID NO: 5):

>NM\_001963.5

aaaaagagaaactggtgggagaggaatcgatatctccatatttcttctttcagcccaatc  
 caagggtgtagctggaactttccatcagttcttcttttcttttctctcctaagccttt  
 gccttgctctgtcacagtgaagtcagccagagcagggtgttaaactctgtgaaattgt  
 cataagggtgtcaggtatttcttactggcttccaaagaacatagataaagaaatctttc  
 ctgtggcttcccttggcaggctgcattcagaaggtctctcagttgaagaaagagcttggg  
 ggacaacagcacaacaggagagtaaaagatgccccagggtgaggcctccgctcaggcag  
 ccgcatctggggtcaatcatactcaccttgcccgggcatgctccagcaaaatcaagctg  
 ttttcttttgaaagttcaaactcatcaagattatgctgctcactcttatcattctgttgc  
 cagtagtttcaaaattagttttgtagtctctcagcaccgcagcactggagctgtcctg  
 aaggtagctctcgaggaatgggaattctacttgtgtgggtcctgcacccttcttaattt  
 tctcccatggaaatagtatctttaggattgacacagaaggaaccaattatgagcaattgg  
 tgggtggatgctgggtgtctcagtgatcatggattttcattataatgagaaaagaatctatt  
 ggggtggatttagaaagacaacttttgcaagagtttttctgaaatgggtcaaggcaagaga  
 gagtatgtaatatagagaaaaatgtttctggaatggcaataaattggataaatgaagaag  
 ttatttgggtcaaatcaacaggaaggaatcattacagtaacagatatgaaaggaaataatt  
 cccacattcttttaagtgctttaaaatatcctgcaaatgtagcagttgatccagtagaaa  
 ggtttatattttggcttccagaggtggctggaagcctttatagagcagatctcgatgggtg  
 tgggagtgaggctctgttggagacatcagagaaaataacagctgtgtcattggatgtgc  
 ttgataagcggctgttttggattcagtacaacagagaaggaagcaattctcttatttgc

cctgtgattatgatggaggttctgtccacattagtaaacatccaacacagcataatgtg  
ttgcaatgtccctttttggtgaccgtatcttctattcaacatggaaaatgaagacaat  
ggatagccaacaaacacactggaaaggacatgggttagaattaacctccattcatcattg  
taccacttggatgaactgaaagtagtgcacacttgccacacccaaggcagaagatgaca  
cttgggagcctgagcagaaactttgcaaattgaggaaaggaaactgcagcagcactgtgt  
gtgggcaagacctccagtcacacttgtgcatgtgtgcagagggatacgccctaagtgcag  
accggaagtactgtgaagatgttaataatgtgtgctttttggaatcatggctgtactctt  
gggtgtaaaaacacccctggatcctattactgcacgtgccctgtaggatttgttctgttc  
ctgatgggaaacgatgtcatcaactgtttcctgtccacgcaatgtgtctgaatgcagcc  
atgactgtgttctgacatcagaaggtcccttatgtttctgtcctgaaggctcagtgttg  
agagagatgggaaaacatgtagcgggtgttcctcaccgataatgggtggatgtagccagc  
tctgcgttctcttagcccagtatcctgggaatgtgattgctttcctgggtatgacctac  
aactggatgaaaaaagctgtgcagcttcaggaccacaaccatttttgcgtgtttgccaatt  
ctcaagatattcgacacatgcattttgatggaacagactatggaactctgctcagccagc  
agatgggaaatggtttatgccctagatcatgacctgtggaaaataagataactttgcc  
atacagccctgaagtggatagagagagctaataatggatgggtcccagcgagaaaggctta  
ttgaggaaggagtagatgtgccagaaggcttctgtgtggactggattggccgtagattct  
attggacagacagagggaaatctctgattggaaggagtgatttaaattgggaaacgttcca  
aaataatcactaaggagaacatctctcaaccacgaggaattgctgttcatccaatggcca  
agagattattctggactgatacagggattaatccacgaattgaaagtcttccctccaag  
gccttggccgtctgggtatagccagctctgatctaacttgccagtggaataacgattg  
acttcttaactgacaagttgtactgggtgcgatgccaagcagctctgtgattgaaatggcca  
atctggatgggttcaaaacgccgaagacttaccagaatgatgtaggctcaccatttgctg  
tagcagtggttgaggattatgtgtgggttctcagattgggctatgccatcagtaatgagag  
taaacaagaggactggcaaagatagagtacgtctccaaggcagcatgctgaagccctcat  
cactgggtgtgggttcatccattggcaaaaccaggagcagatccctgcttatatacaaacg  
gaggctgtgaacataatgtgcaaaaagggttggaaactgcttgggtgttcgtgtcgtgaag  
gttttatgaaagcctcagatgggaaaacgtgtctggctctggatggatcagctgttgg  
caggtgtgaaagttgatctaagaaccaagtaacaccattggacatcttgtccaagacta  
gagtgtcagaagataacattacagaatctcaacacatgctagtggctgaaatcatgggtgt  
cagatcaagatgactgtgctcctgtgggatgcagcatgtatgctcgggtgtatttcagagg  
gagaggatgccacatgtcagtggttgaaggatttgcgtggggatggaaaactatgttctg  
atatagatgaatgtgagatgggtgtcccagtggtgccccctgcctcctccaagtgcata  
acaccgaaggtgggttatgtctgccggtgctcagaaggctaccaaggagatgggattcact  
gtcttgatattgatgagtgccaaactgggggagcacagctgtggagagaatgccagctgca  
caaatacagagggaggctatacctgcatgtgtgctggacgcctgtctgaaccaggactga  
tttgcctgactctactccacccctcacctcaggaagatgaccaccactattccgtaa

gaaatagtgactctgaatgtcccctgtcccacgatgggtactgcctccatgatggtgtgt  
gcatgtatattgaagcattggacaagtatgcatgcaactgtgttgttggctacatcgggg  
agcgatgtcagtaccgagacctgaagtgggtgggaactgcgccacgctggccacgggcagc  
agcagaaggtcatcgtggtggctgtctgcgtgggtgcttgtcatgctgctcctcctga  
gcctgtggggggccactactacaggactcagaagctgctatcgaaaaacccaagaatc  
cttatgaggagtcgagcagagatgtgaggagtcgcaggcctgctgacactgaggatggga  
tgtcctcttgccctcaaccttggtttgtggttataaaagaacaccaagacctcaagaatg  
ggggtcaaccagtggctggtgaggatggccaggcagcagatgggtcaatgcaaccaactt  
catggaggcaggagccccagttatgtggaatgggacagagcaaggctgctggattccag  
tatccagtgataagggctcctgtccccaggtaatggagcgaagcttcatatgccctcct  
atgggacacagacccttgaaggggtgtcgagaagccccattctctcctatcagctaacc  
cattatggcaacaaagggccttgaccaccacaccaaattggagctgactcagtgaaaac  
tggaattaaaaggaaagtcaagaagaatgaactatgtcgatgcacagtatcttttctttc  
aaaagtagagcaaaaactataggttttggttccacaatctctacgactaatcacctactca  
atgcctggagacagatacgtagtgtgtcttttgtttgctcttttaagcagtctcactgca  
gtcttatttccaagtaagagtactgggagaatcactaggttaacttattagaaacccaat  
tgggacaacagtgctttgtaaattgtgttcttcagcagtcatacaaatagatttttg  
tttttgttctcctgcagccccagaagaaattaggggttaaagcagacagtcacactggt  
ttggtcagttacaaagtaatttctttgatctggacagaacatttataatcagtttcatgaa  
atgattggaatattacaataaccgttaagatacagtgtaggcatttaactcctcattggcg  
tggtccatgctgatgattttgcaaaatgagttgtgatgaatcaatgaaaaatgtaattta  
gaaactgatttcttcagaattagatggcttattttttaaataatttgaatgaaaacattt  
tattttttaaataattacacaggaggcttcggagtttcttagtcattactgtccttttccc  
ctacagaattttccctcttgggtgtgattgcacagaatttgtatgtattttcagttacaag  
attgtaagtaaatgcctgatttgttttcattatagacaacgatgaatttcttctaatta  
tttaaataaaatcaccaaaaacataaacattttattgtatgcctgattaagtagttaatt  
atagtctaaggcagtagactagagttgaaccaaattgatttgtcaagcttgctgatgtttct  
gtttttcgttttttttttttttccggagagaggataggatctcactctgttatccaggct  
ggagtgtgcaatggcacaatcatagctcagtcgagcctcaaactcctgggctcaagcaat  
cctcctgcctcagcctcccagtaactaggaccacaggcacaggccaccatgcctggcta  
agggtttttatttttattttttagacatggggatcacacaatgttggccaggctggtct  
tgaactcctggcctcaagcaaggtcgtgctggtaattttgcaaaatgaattgtgattgac  
tttcagcctcccaacgtattagattataggcattagccatgggtgccagccttgaactt  
ttaaaaaattttttaatctacaactctgtagattaaaatttcacatgggtgttctaatta  
aatatttttcttgcagccaagatattgttactacagataacacaacctgatatggtaact  
ttaaattttgggggcttgaatcattcagtttatgcattaactagtccttttgtttatct  
ttcatttctcaacccttgtactttggtgataccagacatcagaataaaaagaaattgaa

gtacctgttttcaaattgataactttataggaattttggttaaagatttggtgatgggagga  
tgacttgaggtttgtggatattagtttaattattcagatgataacctcaccagctaattt

[0026] Por "polipeptídeo do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)", entende-se um polipeptídeo ou fragmento do mesmo com pelo menos cerca de 85% de identidade de aminoácidos com o No. de Acesso NCBI NP\_001954.2 e correspondendo a uma forma de pré-pró-proteína de EGF que é processada para produzir uma molécula de EGF de 53 aminoácidos (mostrada em negrito) e tendo atividade de ligação ao EGFR, conforme reproduzida abaixo (SEQ ID NO: 6):

> NP\_001954.2

MLLTLIILLPVVSKFSFVLSAPQHWSCPEGLAGNGNSTCVGPAPFLIFSHGNSIFRID  
TEGTNYEQLVVDAGVSVIMDFHYNEKRIYWVDLERQLLQRVFLNGSRQERVCNIEKNVSG  
MAINWINEEVIWSNQQEGIITVTDMKGNNSHILLSALKYPANVAVDPVERFIWSSSEVAG  
SLYRADLDGVGVKALLETSEKITAVSLDVLDKRLEFWIQYNREGSNSLICSDYDGGSVHI  
SKHPTQHNLFAMSLFGDRIFYSTWKMKTIIWIANKHTGKDMVRINLHSSFVPLGELKVVHP  
LAQPKAEDDTWEPEQKLCCLRKGNCSSSTVCGQDLQSHLCMCAEGYALSRDRKYCEDVNEC  
AFWNHGCTLGCKNTPGSYYCTCPVGFVLLPDGKRCHQLVSCPRNVSECSHDCVLTSEGPL  
CFCPEGSVLERDGKTCSGCSSPDNGGCSQLCVPLSPVSWECDCFPGYDLQLDEKSCAASG  
PQPFLLFANSQDIRHMHFDGTDYGTLLSQQMGMVYALDHDPEVNIKIYFAHTALKWIERAN  
MDGSQRERLIEEGVDVPEGLAVDWIGRRFYWTDGRKSLIGRSDLNGKRSKIITKENISQP  
RGIAVHPMAKRLFWTDTGINPRIESSLQGLGRLVIASSDLIWPSTGITIDFLTDKLYWCD  
AKQSVIEMANLDGSKRRRLTQNDVGHFPAVAVFEDYVWFSDWAMPVSMRVNKRRTGKDRVR  
LQGSMLKPSLVVHPLAKPGADPCLYQNGGCEHICKRLGTAWCSCREGFMKASDGKTC  
LALDGHQLLAGGEVDLKNQVTPLDILSKTRVSEDNITESQHMLVAEIMVSDQDDCAPVGC  
SMYARCISEGEDATCQCLKGFAGDGKLCSDIDECMGVPVCPASSKCIINTEGGYVCRCS  
EGYQGDGIHCLDIDECQLGEHSCGENASCTNTEGGYTCMCAGRLSEPGLICPDSTPPPHL  
REDDHHYSVRNSDSECPVSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWW  
ELRHAGHGQQQKVIIVVAVCVVVLVMLLLLSLWGAHYRTQKLLSKNPKNPYEESSRDVRS  
RRPADTEDGMSSCPQPFVVIKEHQDLKNGGQPVAGEDGQAADGSMQPTSWRQEPQLCGM  
GTEQGCWIPVSSDKGSCPQVMERSFHMPSTGTQTTLEGGVEKPHSLLSANPLWQQRALDPP  
HQMELTQ

[0027] Por "molécula de ácido nucleico da neuregulina 1 (NRG1)", entende-se um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de NRG1. Uma molécula de ácido nucleico NRG1 exemplificativa é fornecida no

No. de Acesso NCBI BC150609.1 e reproduzida abaixo (SEQ ID NO: 7):

> BC150609.1

```
gagcccttgaccaaactcgccctgcgccgagagccgtccgcgtagagcgctccgtctccg
gcgagatgtccgagcgcaaagaaggcagaggcaaaggggaagggcaagaagaaggagcgag
gctccggcaagaagccggagtcgcgcgggcagccagagcccagccttgccctcccaat
tgaaagagatgaaaagccaggaatcggctgcaggttccaaactagtccttcgggtgtgaaa
ccagttctgaatactcctctctcagattcaagtggttcaagaatgggaatgaattgaatc
gaaaaaacaaccacaaaatatcaagatacaaaaaagccaggggaagtcagaacttcgca
ttaacaaagcatcactggctgattctggagagtatatgtgcaaagtgatcagcaattag
gaaatgacagtgcctctgccaatatcaccatcgtggaatcaaacgagatcatcactggta
tgccagcctcaactgaaggagcatatgtgtcttcagagtcctccattagaatatcagtat
ccacagaaggagcaaatacttcttcatctacatctacatccaccactgggacaagccatc
ttgtaaaatgtgcggaagaaggagaaaactttctgtgtgaatggaggggagtgcttcatgg
tgaaagacctttcaaaccctcgagatacttgtgcaagtgccaacctggattcactggag
caagatgtactgagaatgtgcccatgaaagtccaaaaccaagaaaaggcggagagctgt
accagaagagagtgctgaccataaccggcatctgcatcgccctccttgtggctcggcatca
tgtgtttggtggcctactgcaaaaaccaagaaacagcggaaaaagctgcatgaccgtcttc
ggcagagccttcggctgtaacgaaacaatatgatgaacattgccaatgggcctcaccatc
ctaaccaccccccgagaatgtccagctggtgaaatcaatacgtatctaaaaacgtcatct
ccagtgagcatattggttgagagagaagcagagacatccttttccaccagtactatactt
ccacagcccatacactcactactgtcaccagactcctagccacagctggagcaacggac
aactgaaagcatcctttccgaaagccactctgtaatcgtgatgtcatccgtagaaaaca
gtaggcacagcagcccactgggggcccagaggagctcttaatggcacaggaggccctc
gtgaatgtaacagcttctcaggcatgccagagaaaccctgattcctaccgagactctc
ctcatagtgaaggtatgtgtcagccatgaccacccggctcgtatgtcacctgtagatt
tccacacgccaagctccccaaatcgcccccttcggaatgtctccaccggtgtccagca
tgacgggtgtccatgccttccatggcggctcagccccttcatggaagaagagagagacctctac
ttctcgtgacaccaccaaggctgcgggagaagaagtttgaccatcaccctcagcagttca
gctccttccaccacaaccccgcgcatgacagtaacagcctccctgctagccccttgagga
tagtgaggatgaggagatgaaacgacccaagagtagcagccagcccagagcctgtta
agaaactcgccaatagccggcgggcccagaaccaagcccattggccacattgctaaca
gattggaagtggacagcaacacaagctcccagagcagtaactcagagagtgaaacagaag
atgaaagagtaggtgaagatacgcctttcctgggcatacagaaccccctggcagccagtc
ttgaggcaacacctgccttccgcctggctgacagcaggactaacccagcaggccgcttct
cgacacaggaagaaatccaggccaggctgtctagtgtaatgctaaccaagaccctattg
```



tcctccttctgcttttacttctcctgcatgacagttgttttcttcatctgagcagacacc  
agcttcagatgctcgaggtgagaaacatgcctttcagtttgggctactggttacttaat  
taatcagccggcagctccgtcgatctattttcgtccctgtcctcttgacgagcccgggat  
ggtttgagtagcatttaaagaactagaaaagtggcccagaaacagcagcttaaagaat  
tattacgatatactttgattttgtagttgctaggagcttttcttcccccttgcatcttt  
ctgaactcttcttgattttaataatggccttggacttggacgatttatcgatttccccct  
gtaagatgctgtatcatttggttggggggcctctgctggtaatggaccgtgagagcgg  
ccaggccttcttctggaggtgagccgatggagatttattccccagacatgtctgaggtcg  
ccgccgagaggtcctccagcccctcactcagctgagtgcagacccatctcttgatgggc  
ttccggcagcagaagacatgccagagcccagactgaagatgggagaaccctggactcg  
tgggcctggccgtgccctgctgtgctgctagaagctgagcgcctgagaggttgccctca  
actcagagaaaatctgcattgtccccatcctggcttgctggtcagcctctgcctctgca  
tcgccggcctcaagtgggtatttgtggacaagatctttgaatatgactctcctactcacc  
ttgaccctggggggttaggccaggaccctattatttctctggacgcaactgctgcctcag  
ctgtgtgggtgctgctgagggcatacacttcacctgtctctagggctcaatctgaaagtg  
aggttcaagttacagtgcaaggtgacaaggtggtgtctcctttgaaccatcagcggcac  
cgacaccgaagaatcgatttttgccttttcttcttgcctccactgcgccatccttcc  
cttcaccaccggaaaccctgaggtgagaacgcccagtcagcaactcagccacaaacaa  
cagaaactaatctccaaactgctcctaaactttctacatctacatccaccactgggacaa  
gccatcttgtaaaatgtgctgggagaaggagaaaactttctgtgtgaaatggaggggagtgct  
tcatggtgaaagaccttcaaacctcagagatacttgtgcaagtgcccaaatgagttta  
ctgggtgatcgctgcaaaaactacgtaatggccagcttctacaagcatcttgggattgaa  
ttatggaggcggaggagctgtaccagaagagagtgctgaccataaccggcatctgcatcg  
ccctccttggtgctggcatcatgtgtggtggcctactgcaaaaaccaagaaacagcggg  
aaaagctgcatgaccgtcttcggcagagccttcggctgtaacgaaacaatatgatgaaca  
ttgccaatgggcctcaccatcctaaccacccccgagaatgtccagctgggtgaaatcaat  
acgtatctaaaaacgtcatctccagtgagcatattggtgagagagaagcagagacatcct  
tttccaccagtcactatacttccacagcccactcactccactactgtcaccagactccta  
gccacagctggagcaacggacacactgaaagcatcctttccgaaagccactctgtaatcg  
tgatgtcatccgtagaaaacagtaggcacagcagcccaactgggggccaagaggacgtc  
ttaatggcacaggaggcctcgtgaaatgtaacagcttctcaggcatgccagagaaaccc  
ctgattcctaccgagactctcctcatagtgaaggtatgtgtcagccatgaccacccgg  
ctcgtatgtcacctgtagatttccacacgccaagctccccaaatcgcccccttcggaaa  
tgtctccaccctgtccagcatgacgggtgtccatgccttccatggcgggtcagccccttca  
tggagaagagagaccttacttctcgtgacaccaccaaggctgcgggagaagaagtttg  
accatcacctcagcagttcagctccttccaccacaacccccgcgcatgacagtaacagcc  
tcctgctagccccttgaggatagtgaggatgaggagatgaaacgacccaagagtacg

agccagcccaagagcctgttaagaaactcgccaatagccggcgggccaaaagaaccaagc  
ccaatggccacattgctaacagattggaagtggacagcaacacaagctcccagagcagta  
actcagagagtgaaacagaagatgaaagagttaggtgaagatacgctttcctgggcatac  
agaaccccctggcagccagtcttgaggcaacacctgccttccgctggctgacagcagga  
ctaaccagcaggccgcttctcgacacaggaagaaatccaggccaggctgtctagtgtaa  
ttgctaaccaagaccctattgctgtataaaacctaataaacacatagattcacctgtaa  
aactttatttatataataaagtattccaccttaaatcaatattttattttagc  
agttctgcaaatagaaaacaggaaaaaactttttataaattaaatatatgtatgtaaaaa  
tgtgttatgtgccatatgtagcaattttttacagtatttcaaacgagaaagatatcaat  
ggcctttatgttatgttatgtcgagagcaagttttgtacagttacagtgattgctttt  
ccacagtatcttgcaaaacctctcatagattcagtttttgctggcttcttgctgattgc  
attatgatgttgactggatgtatgatttgaagacttgcaactgtccctctgtttgcttg  
tagtagcaccgatcagtatgtcttgtaatggcacatccatccagatatgcctctctgtg  
gtatgaagttttctttgctttcagaatatgaaatgagttgtgtctactctgccagccaaa  
ggtttgctcattgggctctgagataatagtagatccaacagcatgctactatataatac  
agcaagaaactgcattaagtaatgttaaatattaggaagaaagtaatactgtgatttaa  
aaaaactatattattaatcagaagacagcttgctcttactaaaaggagctctcatttact  
ttatgtgattttatctttcttgacaaaaagcaacagtttttagggatagcttagaaaatgg  
gttctggcttgctatcagggtaaatctaacaccttacaagaggactgagtgctactttct  
ctctgggggaatgatccagcagcttatctagttgacaatcaaacacggctgataaaggt  
gcaatcatttctgacatgtatcttactgattttgaagctagtgattggttgtgtcttc  
ttggctcaaaaagaagcatattacggcacaaaaagcccagcccagacagcacatgcagca  
ttttgtctgaaatacttctagagtcaaactgcctgctgtacatagcgatgacttgtcat  
cataggggaagtatttccatcgtagagtgttcagaaggagtgactgtataggtggagagaa  
gcttagtgactccggtgaaattttaaaatgtggatgaccaccctttctcccccttattt  
ttcttttatctttccatggttgcttgatcaggtcataactatgcatgaacattttttatc  
aggaatggccgatgtgtatgtgatttgaatcacaagtaatgattcatcaggaaatgtca  
atcctgttgaaagattgcacctttacttgcagaagtgacccccacctgtgtcctgacct  
ctccatttacaggctctctcaccatttccccacctcctttaatttttgctttactgtc  
ataaagtaggactaagattggctaaagcattgcatgttcttttgatggtaaatccaaa  
ggaaggcctataagtattaacatttgaataactgctaattcaggaaaatggaagaaaa  
aaattatttgaaacacagaaccatttcatggcctgcctgatatctgtgaaatcagggt  
ggagctttacttaggattcacatggcctcctaggaaccatgggacaaatgggaaacaggt  
tatcgggggattcatgaagtcagtgagagtaattgcttcttttttgcggtgaaactgaat  
gtatttcttccaaaatcttgatgttaacaattaaaaagaagaaatgacatgcaagtagg  
tcttagcagaaaaatgcaggctgggcatgagtcattgtttaccctcccacatgctccta  
caatccacagagatgcctgtctgcaggttcttgaagttattgttagtatttggtatctca

aatttttcgctcactggtcacatgccactttctctgtgacagtggtatcctcatttgctt  
tttaacctacactgaggagtctttgtcaggttgactgattttccaattctgcagtaatg  
agtaagctcacggcatggggaagaagacagtcagccaatgaagttctctaaattat  
aacattgcctttgaaggccttgactcatccttagctattttcaatgaagaaattcctacca  
tgaatttaaaaccctaaaaattctgtttcaaattctttgggcattggggtactcagatat  
cccattgtggaagaattttaagaataaatagaagtttctggtgagaacatgagcaacat  
gtttcttacaatgagaattgctatgcattttaaaattgcaaataatataatgaaaattgaag  
acaagaggaaattgtattttctaacttgattctgatcactcacagaggtggcatattatta  
tagttgggacatcctttgcacccttcataaaaaaggccagctgactgctcagcatcacct  
gccaaaggccactagatttgtgtttacaggggtatctctgtgatgcttgtcacatcactct  
tgaccacctctgttaataaattccgacagtgagtgccgatcggagtgatgaacttatgtt  
cccagcatatggaaagctatcttaggttttaaggtagtagaaattgccaggagtttgac  
agcaactttgtttccgggtctaaaatcgtatccactgaggtgatgcagtgagcata  
atacatgcaaatacatgcaaaactcctttgtttcacctaagattcactttctatcttac  
tttcccttctgcctagtgacttttgcaccaagagtgctggacagcattctagttt  
ctacaaaatggctctctgtgtaggtgaatgtgtcccaaacctgctatcactttctgttt  
cagtggtgactgtcttgttagaggtgaagtttatccagggtaacttgctcactaactatc  
ctttttatggcctggggttaaagggcgcatggctcacactgggtgaaaataaggaaggcct  
ggcttatcttgtattaataactggctgcattccaccagccagagatttctatctgcg  
aagacctatgaaacactgaagagaaatgtaggcagaaggaaatggccacatatcacaagt  
tctattatatattcttttgtaaatacatattgtatattacttggatgttttcttatatca  
tttactgtcttttgagttaatgtcagtttttactctctcaacttactatgtaacattgt  
aaataacataatgtcctttattatattatattaagcatctaacatatagagttgttttca  
tataagtttaagataaatgtcaaaaatataatgttcttttgtttttctttgctttaaatt  
atgtatcttttcttttcttttttttaagaataatttattgttcaggagaaagaatgtat  
atgtaactgaaactatctgaagaatgcacattgaaggccgtgaggtactgataaactaaa  
gaatttattattcaaaataactaagcaataagtaattgtgatttatttaaagttttgtcca  
ttttccatgaaagacatactgcaataaaaatgctactctgtggaaaaaaaaaaaaaaaa  
a

[0030] Por "polipeptídeo 1 da neuregulina 1 $\beta$  (NRG1 $\beta$ )" entende-se um polipeptídeo ou fragmento do mesmo com pelo menos cerca de 85% de identidade de aminoácidos com o No. de acesso NCBI NP\_001309134.1 e com atividade de ligação à neuregulina 1 (NRG1), conforme reproduzida abaixo (SEQ ID NO : 10):

> NP\_001309134.1

MEIYSPDMSEVAAERSSSPSTQLSADPSLDGLPAAEDMPEPQTEDGRTPGLVGLAVPCCA

CLEAERLRGCLNSEKICIVPILACLVSCLLCIAGLKWVFDKIFEYDSPHLDPGGLGQD  
 PIIISLDATEASAVVWSSEAYTSPVSRQSESEVQVTVQGDKAVVSFEPSAAPTPKNRIFA  
 FSFLPSTAPSFPSPTRNPEVRTPKSATQPQTETNLQTAPKLSTSTSTTGTSHLVKCAEK  
 EKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKHLGIEFMEAEELYQ  
 KRVLTTITGICIALLVVGIMCVVAYCKTKKQRKKLHDRLRQSLRSENNMMNIANGPHHPN  
 PPPENVQLVNQYVSKNVISSEHIVEREAETSFSSTSHYTSTAHHSTTVTQTTPSHSWSNGHT  
 ESILSESHSVIVMSSVENSRRHSSPTGGPRGRLNGTGGPRECNSFLRHARETPDSYRDSPH  
 SERYVSAMTTPARMSPVDFHTPSSPKSPSEMSPVSSMTVSMPSMAVSPFMEEERPLLL  
 VTPPRLREKKFDHHPQQFSSFHHPAHDNSNLPASPLRIVEDEEYETTQEYEPAQEPVKK  
 LANSRRAKRTKPNGHIANRLEVDSNTSSQSSNSESETEDERVGEDTPFLGIQNPLAASLE  
 ATPAFRLADSRTPNAGRFSTQEEIQARLSSVIANQDPIAV

[0031] Por "polipeptídeo híbrido NRG-BVN" entende-se um polipeptídeo ou fragmento do mesmo tendo pelo menos cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos abaixo (SEQ ID NO: 11):

> Híbrido NRG-BVN

GTSHLVKCPLSHEAYCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASF

[0032] Por "polipeptídeo híbrido TGF $\alpha$ " entende-se um polipeptídeo ou fragmento do mesmo tendo pelo menos cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% identidade de aminoácido com a sequência de aminoácidos abaixo (SEQ ID NO: 12):

> TGF-BVN-híbrido

NTENDCPLSHEAYCLHDGVCVCRFLVQEDKPACVVCVVGYGVCRCQFRDLRWWDAR

[0033] Os intervalos podem ser expressos aqui como de "cerca de" um valor específico e / ou a "cerca" outro valor específico. Quando esse intervalo é expresso, outro aspecto inclui desde um valor particular e / ou até outro valor particular. Da mesma forma, quando os valores são expressos como aproximações, pelo uso do antecedente "cerca de", entende-se que o valor específico forma outro aspecto. Entende-se ainda que os pontos finais de cada um dos intervalos são significativos em relação ao outro ponto final e independentemente do outro ponto final. Também entende-se que existem vários valores aqui des-

critos, e que cada valor também é aqui descrito como "cerca de" esse valor específico, além do próprio valor. Entende-se também que, em todo o pedido, os dados são fornecidos em vários formatos diferentes e que esses dados representam pontos finais e pontos de partida e intervalos para qualquer combinação dos pontos de dados. Por exemplo, se um ponto de dados específico "10" e um ponto de dados específico "15" forem descritos, entende-se que maior que, maior ou igual a, menor que, menor ou igual a, e igual a 10 e 15 são considerados descritos, bem como entre 10 e 15. Entende-se também que cada unidade entre duas unidades particulares também é descrita. Por exemplo, se 10 e 15 são descritos, 11, 12, 13 e 14 também são descritos.

[0034] Os intervalos aqui fornecidos são entendidos como atalhos para todos os valores dentro do intervalo. Por exemplo, entende-se que um intervalo de 1 a 50 inclui qualquer número, combinação de números ou subintervalo do grupo que consiste de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50, bem como todos os valores decimais intermediários entre os números inteiros mencionados acima, tal como, por exemplo, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 e 1,9. Com relação aos subintervalos, "subintervalos aninhados" que se estendem a partir de qualquer ponto final do intervalo são especificamente considerados. Por exemplo, um subintervalo aninhado de um intervalo exemplificativo de 1 a 50 pode compreender 1 a 10, 1 a 20, 1 a 30 e 1 a 40 em uma direção ou 50 a 40, 50 a 30, 50 a 20 e 50 a 10 na outra direção.

[0035] Onde aplicável ou não especificamente citado, qualquer uma das modalidades descritas neste documento é considerada como sendo capaz de se combinar com qualquer outra modalidade ou uma ou mais modalidades, mesmo que as modalidades sejam descritas sob diferentes aspectos da descrição.

[0036] Estas e outras modalidades são descritas e / ou abrangidas pela seguinte Descrição Detalhada.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0037] A descrição detalhada a seguir, dada a título de exemplo, mas não pretendendo limitar a descrição apenas às modalidades específicas descritas, pode ser compreendida melhor em conjunto com os desenhos em anexo, nos quais:

[0038] As Figuras 1A-1B representam domínios e características para uma proteína sintética de acordo com uma modalidade exemplificativa da descrição. A Figura 1A representa a sequência de aminoácidos de BVN22E, incluindo os domínios 1 & 2 da Via de Sinalização Direcionada (TSP) mostrados em sublinhado único, duas sequências ligantes mostradas em sublinhado duplo, e um Domínio Veículo Imunogênico mostrado em sublinhado tracejado. A Figura 1B mostra um alinhamento Clustal Omega das regiões do fator de crescimento epidérmico sintético (sEGF) de BVN22E alinhado com as regiões correspondentes de EGF humano (hEGF).

[0039] A Figura 2 mostra um gráfico da titulação da fração de IgG purificada a partir de 5 coelhos imunizados com a ligação BVN22E ao fator de crescimento epidérmico humano recombinante imobilizado (rhEGF) revestido em uma concentração de 1 µg / ml de acordo com uma modalidade exemplificativa da descrição.

[0040] A Figura 3 mostra um gráfico representando uma comparação da fração de IgG reunida a partir de 5 coelhos após a imunização com BVN22E ou uma proteína equivalente contendo 2 domínios do fator de crescimento epidérmico (EGF) nativo de acordo com uma modalidade exemplificativa da descrição.

[0041] As Figuras 4A-4B mostram Western blots ilustrando a capacidade de BVN22E de estimular a fosforilação. A Figura 4A mostra um Western blot ilustrando que BVN22E é capaz de estimular a fosfo-

rilação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) das células A431 na mesma extensão que uma molécula semelhante contendo domínios de EGF humano nativo, de uma maneira concentração-dependente. A Figura 4B mostra os resultados de outro ensaio sem comparação com uma molécula baseada em EGF.

[0042] A Figura 5 representa um Western blot mostrando IgG combinada purificada a partir de 5 coelhos imunizados com BVN22E em duas concentrações, capaz de neutralizar a ativação de EGFR de células A431 por 30 ng / ml de rhEGF de maneira semelhante a um anticorpo monoclonal neutralizante comercialmente disponível.

[0043] A Figura 6 representa um Western blot mostrando que os soros de todos os 5 coelhos imunizados com BVN22E são capazes de neutralizar a ativação de EGFR das células A431 por 30 ng / ml de rhEGF de maneira semelhante a um anticorpo monoclonal neutralizante comercialmente disponível.

[0044] A Figura 7 mostra um Western blot mostrando que os soros reunidos de coelhos submetidos à imunização com BVN22E são capazes de neutralizar a sinalização de EGFR a partir de 30 ng / ml de rhEGF em células A431 após apenas uma injeção de reforço (sangramento de teste 1; pista 6) tão efetivamente quanto um anticorpo monoclonal neutralizante. O soro dos animais antes da imunização não tem atividade neutralizante (pista 5).

[0045] A Figura 8 mostra um Western blot mostrando que a atividade neutralizante de IgG purificada a partir de soros de coelhos imunizados contra BVN22E é semelhante à de animais imunizados com uma molécula comparável incluindo apenas domínios nativos de EGF.

[0046] A Figura 9 representa um Western blot mostrando a inibição da via de sinalização de EGF por soros combinados (n = 10) derivados de camundongos imunizados com BVN22E ou um imunogene contendo EGF humano nativo quimicamente conjugado (hEGF). As

pistas 4-6 demonstram que a imunização com BVN22E gerou maior capacidade de neutralização de EGF do que um imunogene baseado em hEGF nativo.

[0047] A Figura 10 mostra um gel SDS corado por Coomassie de uma molécula sintética de NRG-CTB na qual Un = nativo, D = desnaturado por calor, R = reduzido, RD = reduzido e desnaturado.

[0048] A Figura 11 mostra um Western Blot anti-NRG de uma molécula sintética de NRG-CTB na qual Un = nativo, D = desnaturado por calor, R = A reduzido, RD = reduzido e desnaturado.

[0049] Figura 12 mostra os resultados de um ensaio de ativação de células MCF-7. O painel superior mostra a ativação (por exemplo, fosforilação) do receptor ERB3 por rhNRG-1 $\beta$  (pista 2), a molécula sintética de NRG-CTB (pista 4) e a inibição de ambos com um anticorpo neutralizante (pistas 3 e 5), enquanto o painel inferior é um controle para a expressão do receptor ERB3.

[0050] As Figuras 13A-13C mostram um gel SDS de uma molécula de TGF $\alpha$  sintética. A Figura 13A mostra um gel SDS corado com Coomassie. A Figura 13B é um Western blot do gel SDS na Figura 13A, que foi corada com anticorpos anti-TGF $\alpha$  para mostrar que a molécula sintética de TGF $\alpha$  é reconhecida por dois anticorpos anti-TGF $\alpha$  neutralizantes diferentes. A Figura 13C é um Western blot do gel SDS na Figura 13A, que foi corado com anticorpos anti-EGF para mostrar que dois anticorpos anti-EGF diferentes não reconhecem a molécula sintética de TGF $\alpha$ .

[0051] A Figura 14 representa um gel nativo corado com Coomassie Blue, mostrando que a purificação de uma molécula sintética de TGF $\alpha$  produz uma única banda de pentâmero.

[0052] As Figuras 15A-15B mostram um gel SDS corado com Coomassie e um Western blot anti-TGF $\alpha$ , respectivamente, que mostram que a molécula sintética de TGF $\alpha$  mostra estabilidade melhorada,

permanecendo como uma banda discreta de pentâmero após mais de três semanas a temperaturas elevadas (por exemplo, temperatura ambiente e 37° C).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0053] A presente descrição é baseada, pelo menos em parte, na descoberta de que proteínas / moléculas sintéticas, incluindo um ou mais domínios proteicos a partir de um fator de crescimento sintético, uma ou mais regiões ligantes, e um ou mais domínios imunogênicos podem ser usadas como moléculas terapêuticas para tratar uma variedade de doenças tal como, por exemplo, câncer. As moléculas sintéticas fornecem várias vantagens inesperadas sobre a técnica anterior. Por exemplo, ao contrário das moléculas do Fator de Crescimento Epidérmico humano (hEGF) da técnica anterior (por exemplo, Patente US No. 5.984.018 de Davila e outros) que estão presentes em misturas heterogêneas contendo até 12 espécies moleculares diferentes, as proteínas / moléculas sintéticas descritas neste documento podem ser produzidas como uma única molécula (por exemplo, uma população homogênea de moléculas). Além disso, as proteínas / moléculas sintéticas aqui descritas incluem dez componentes ativos por molécula (embora os componentes ativos possam ser aumentados ou diminuídos em múltiplos de 5, por exemplo, como parte de um pentâmero), enquanto as moléculas de hEGF da técnica anterior (por exemplo, Patente US. No 5.984.018 de Davila e outros) são altamente variáveis no número de componentes ativos presentes por molécula (por exemplo, o número médio de componentes ativos por molécula de Davila é 1,5). Além disso, as proteínas / moléculas sintéticas aqui descritas são muito mais simples de fabricar. Por exemplo, as moléculas de hEGF da técnica anterior (por exemplo, Patente U.S. No. 5.984.018) são produzidas por conjugação química de rP64k e EGF humano recombinante (rhEGF) para produzir uma molécula final que consiste de duas molé-

culas quimicamente conjugadas entre si. Isto está em nítido contraste com as proteínas / moléculas sintéticas aqui descritas, que são uma única molécula sintética. Vantajosamente, as técnicas aqui apresentadas fornecem novas proteínas sintéticas que podem ser usadas terapêuticamente para tratar doenças tal como, por exemplo, câncer (por exemplo, vacinas contra câncer) com um nível de atividade imunogênica mais alto do que os métodos da técnica anterior (por exemplo, Patente US. No. 5.984.018).

### Visão Geral

[0054] A imunologia do câncer é o estudo das interações entre o sistema imunológico e as células cancerosas, tal como, por exemplo, tumores ou malignidades. O início de uma resposta imune, tal como o reconhecimento de antígenos específicos para o câncer, que são expressos por tumores humanos e não expressos em tecidos normais, é de particular interesse. Geralmente, os métodos para controlar a divisão e proliferação das células malignas têm se concentrado no isolamento desses antígenos e na sua apresentação, de modo que eles sejam reconhecidos pelo sistema imunológico como não autoantígenos para induzir uma resposta imune específica.

[0055] Atualmente, há um número significativo de fatores de crescimento identificados, e a maioria, se não todos, demonstrou ser importantes mediadores da proliferação celular em vários tipos de câncer, além de estar implicada em outras condições da doença. Geralmente, os fatores de crescimento são proteínas séricas solúveis que reconhecem e se ligam a um grupo de receptores de fatores de crescimento localizados na superfície celular. Os fatores de crescimento específicos podem ser específicos para um único receptor ou podem se ligar a mais de um receptor intimamente relacionado com diferentes afinidades. Da mesma forma, alguns receptores se ligam a apenas um único ligante do fator de crescimento, enquanto outros podem se ligar

a múltiplos fatores de crescimento relacionados, novamente geralmente com afinidades diferentes. Após a ligação ao seu receptor natural, o domínio citoplasmático do receptor é fosforilado, e isso inicia uma cascata de sinalização intracelular que resulta na modulação da transcrição de um ou mais genes e, finalmente, na progressão através do ciclo celular e proliferação celular.

[0056] Os fatores de crescimento e seus receptores são componentes essenciais dos processos normais de crescimento, desenvolvimento e reparo, e seus perfis de distribuição de tecidos e níveis de expressão regulam estreitamente o crescimento celular. Numerosos estudos mostraram que os fatores de crescimento podem estimular a proliferação de vários tipos de células *in vitro* e *in vivo* (Cohen S., Carpenter G., PNAS USA 72, 1317, 1975, Witsch E e outros: Physiology: 25 (2): 85 a 101, (2010)). Além disso, certos fatores de crescimento revelaram estimular a proliferação em algumas linhagens celulares de câncer. Por exemplo, o fator de crescimento epidérmico (EGF) pode estimular algumas células de carcinoma de pulmão de células não pequenas (Osborne C. K. e outros, Can Res. 40, 2. 361 (1980)). Outros fatores de crescimento, tal como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), são importantes em várias doenças oncológicas, tal como câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) (Ballas MS, Chachoua A., Onco Targets and Therapy: 4, 43 a 58 (2011)), câncer de próstata (Cox ME e outros; Prostate 69 (I): 33 a 40 (2009)), e câncer de mama (Lei J e outros, Cancer Res; 68,24: 10238 a 10346 (2008)).

[0057] Níveis elevados de vários receptores de fatores de crescimento foram relatados em tecidos malignos. Por exemplo, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) foi detectado em níveis incomumente altos em tumores malignos de origem epitelial, tal como

câncer de pulmão, mama, bexiga, ovário, vulva, cólon, pulmonar, cérebro e esôfago. O papel desempenhado pelos fatores de crescimento e seus receptores na regulação do crescimento do tumor é desconhecido, mas há sugestões de que a expressão do receptor do fator de crescimento nas células tumorais forneça um mecanismo para a estimulação autócrina do crescimento, que leva à proliferação descontrolada (Schlessinger J., Schreiber AB, Levi A., Liberman T., Yarden Y. Crit. Rev. Biochem. 1983, 14 (2) 93 a 111). Além disso, Liao Y e outros; Hum Pathol 36 (11): 1186 a 1196 (2005) e Cox ME e outros; Prostate: 69 (1) 33 a 40 (2009) descrevem o papel do aumento do receptor Insular e do fator de crescimento no câncer de próstata metastático.

[0058] Uma estratégia de tratamento para direcionar a sinalização do fator de crescimento na terapia do câncer tem sido o uso de uma imunoterapia passiva (por exemplo, anticorpos monoclonais) contra os receptores particulares / receptores envolvidos. Tais estudos demonstraram que o reconhecimento específico por um anticorpo do receptor capaz de inibir a ligação do ligante pode ter um efeito inibitório sobre a estimulação mitogênica de células malignas (SATO J. D., e outros Methods in Enzymology, vol. 146, pág. 63 a 81, 1987). No entanto, os anticorpos que são de origem murina geralmente produzem uma resposta de anticorpo humano anticamundongo (HAMA), limitando-os assim a uma única administração.

[0059] Outras estratégias de tratamento têm sido o uso de uma imunoterapia ativa com vacinas que contêm o fator de crescimento de interesse para induzir uma resposta imune contra a molécula para inibir o efeito de proliferação do fator de crescimento em tumores. A Patente No. 5.984.018, de Davila e outros, intitulada Vaccine Composition Comprising Autologous Epidermal Growth Factor or a Fragment or a Derivative Thereof having Anti-tumor Activity and use Thereof in the

Therapy of Malignant Diseases, descreve, por exemplo, o uso de uma vacina que contém uma mistura de um fator de crescimento e uma proteína carreadora imunogênica (ou seja, não humana) conjugada quimicamente em conjunto com glutaraldeído. No entanto, sem estar vinculado a nenhuma teoria em particular, acredita-se que a conjugação química dificulta as respostas imunes contra a vacina.

[0060] Essa é uma abordagem tecnicamente desafiadora, à medida que exige que o hospedeiro gere uma resposta imune a um 'auto-antígeno', e o sistema imunológico de vertebrados tenha evoluído para impedir que essas respostas ocorram. Quando uma forte resposta imune é gerada contra um autoantígeno, por exemplo, um que inclui a ativação de células T auxiliares, geralmente ocorre um estado de doença autoimune. Por muitos anos, foi levantada a hipótese de que alguns distúrbios autoimunes, por exemplo, lúpus, esclerose múltipla (MS), diabetes etc., podem ser causados pela exposição precoce a um agente ambiental que inclui epítomos imunogênicos (epítomos de células T) que imitam intimamente os autoepítomos do hospedeiro. Isso poderia levar à estimulação de células T auxiliares que são reativas cruzadas com epítomos hospedeiros. A subsequente exposição ao agente ambiental pode então resultar em uma resposta antiautoimune (Albert, L. J. e Inman, R. D. New England Journal of Medicine, 30 de dezembro, pág. 2068 a 2074, 1999). Desde então, foi demonstrado que um antígeno viral pode, de fato, gerar uma resposta autoimune contra uma proteína de célula nervosa (Levin, M. C. e outros, Nature Medicine vol 8 (5) pág. 509 a 513, 2002).

[0061] A Publicação US. No. 2006/0251654, de Casimiro e outros, intitulada Method for Treatment of Malignant and Infectious Chronic Diseases, (a publicação '654) descreve um método de tratamento de um indivíduo portador de uma doença crônica maligna ou infecciosa que compreende o método de imunizar o indivíduo com uma vacina

contendo um autoantígeno associado à doença crônica maligna ou infecciosa que é acoplada a uma proteína carreadora; tratar o indivíduo com um agente modulador imune; e imunizar o indivíduo novamente com a vacina da etapa 1, e um adjuvante apropriado selecionado a partir de hidróxido de alumínio e Montanide ISA 51 (Seppic, Paris, França). Infelizmente, acredita-se que a preparação da vacina por conjugação química dificulta a resposta imune.

[0062] A maioria das vacinas descritas acima exibe uma série de limitações, decorrentes principalmente do método de fabricação e da potencial falta de uniformidade e homologia do produto proteico. As vacinas descritas acima compreendem geralmente uma mistura de uma proteína carreadora recombinante e polipeptídeos de origem humana que são quimicamente conjugados usando glutaraldeído. Infelizmente, este reagente reativo pode formar ligações cruzadas covalentes indesejáveis entre variedades de grupos químicos e geralmente leva a um produto altamente heterogêneo. Assim, as vacinas resultantes podem compreender não apenas moléculas de proteína carreadora com números variáveis do polipeptídeo humano alvo anexado (por exemplo, 0, 1, 2, 3, etc.), mas cada um dos polipeptídeos humanos pode ser ligado ao veículo através de átomos diferentes e, portanto, em posições diferentes e em orientações diferentes. Além disso, tanto as moléculas do polipeptídeo quanto da proteína carreadora alvo podem ser conjugadas entre si, resultando em vários homo-multímeros que podem não ter eficácia clínica e podem não contribuir para uma resposta imune do paciente anticâncer.

#### Proteínas / Moléculas Sintéticas

[0063] A presente descrição fornece uma proteína / molécula sintética homogênea para melhorar a apresentação do número máximo de epítopos de fator de crescimento, epítopos de antígeno tumoral e / ou sítios de ligação a receptores como elementos de uma proteína /

molécula sintética imunogênica. Em uma modalidade ilustrativa, uma proteína / molécula sintética que expressa toda ou parte de um domínio veículo imunogênico (por exemplo, toxina B da cólera (CT-B)) e um fator de crescimento epidérmico sintético (sEGF), um antígeno tumoral e / ou um receptor é descrita. Em modalidades ilustrativas alternativas, a proteína pode expressar outras proteínas / moléculas sintéticas ou recombinantes imunogênicas que são modeladas com base em proteínas imunogênicas conhecidas. É considerado dentro do escopo da descrição que tais proteínas / moléculas sintéticas podem expressar polipeptídeos que são altamente imunogênicos para o sistema imunológico humano. Preferencialmente, as proteínas / moléculas sintéticas conferem propriedades adicionais à proteína quimérica, tal como, por exemplo, alto rendimento de expressão e facilidade de fabricação, estabilidade oral e a capacidade de passar do intestino para a corrente sanguínea, e / ou uso seguro anterior em humanos.

[0064] Em uma modalidade ilustrativa, as proteínas / moléculas sintéticas aqui descritas podem incluir ou expressar uma alta proporção de uma sequência de proteínas derivada de autoantígenos alvo, em função do peso molecular total. Isto pode ser conseguido, por exemplo, usando um modelo de proteína grande contendo múltiplos epítomos de fator de crescimento. Esses epítomos de fator de crescimento podem ser várias cópias de todo ou parte de um único fator de crescimento ou cópias de todo ou parte de mais de um fator de crescimento diferente. Estes epítomos do fator de crescimento podem ser naturais ou sintéticos (por exemplo, artificiais). Por exemplo, BVN22E, uma proteína sintética ilustrativa aqui descrita, pode ter um peso molecular de cerca de 120 kD. Em uma modalidade ilustrativa, os epítomos do fator de crescimento aqui descritos podem corresponder a um ou mais domínios dentro do domínio de fator de crescimento (por exemplo, domínios da via de sinalização direcionada a EGF (TSP)). Em

uma modalidade ilustrativa, um domínio EGF pode incluir a região que apresenta ou restringe o loop- $\beta$ , por exemplo, a região definida por cerca de cisteína 6 a cerca de cisteína 42, a região definida por cerca de cisteína 6 a cerca de cisteína 31 ou a região definida por cerca de cisteína 22 a cerca de cisteína 33 ou a região definida por cerca de cisteína 22 a cerca de cisteína 31 ou a região definida por cerca de cisteína 62 a cerca de cisteína 14 da sequência de proteína sintética (por exemplo, Figura 1A). Sem estar vinculado a nenhuma teoria em particular, é considerado dentro do escopo da descrição que diferentes regiões ou sub-regiões entre a cisteína 6 e a cisteína 42 podem ter efeitos benéficos quando incorporadas nas proteínas / moléculas sintéticas da descrição. Por exemplo, as seguintes regiões podem ter efeitos benéficos: a região entre a cisteína 6 e a cisteína 14, a região entre a cisteína 6 e a cisteína 20, a região entre a cisteína 6 e a cisteína 31, a região entre a cisteína 6 e a cisteína 33, e a região entre a cisteína 6 e a cisteína 42. Também é considerado dentro do escopo da descrição que a sequência progressiva reversa também pode ser benéfica. Por exemplo, as seguintes regiões podem ter efeitos benéficos: a região entre a cisteína 42 e a cisteína 33, a região entre a cisteína 42 e a cisteína 31, a região entre a cisteína 42 e a cisteína 20, a região entre a cisteína 42 e a cisteína 14, e a região entre a cisteína 42 e a cisteína 6. É ainda considerado dentro do escopo da invenção que intervalos específicos dentro da região entre a cisteína 6 e a cisteína 42 podem fornecer efeitos benéficos quando incorporados nas proteínas / moléculas sintéticas da descrição (por exemplo, a região entre cisteína 6 e cisteína 14, a região entre a cisteína 14 e a cisteína 20, a região entre a cisteína 20 e a cisteína 31, e a região entre a cisteína 33 e a cisteína 42).

[0065] De acordo com a descrição, as expressões dos epítomos do fator de crescimento devem ser dobradas, permitindo que sua confor-

mação natural seja substancialmente retida e apresentada aos componentes do sistema imunológico do hospedeiro, de modo a provocar uma resposta imune do hospedeiro robusta aos ditos epítomos. Exemplos de modelos de proteínas naturais adequados para modelar um domínio de suporte de epítomo de proteínas / moléculas sintéticas incluem, mas não estão limitados a, subunidade de toxina B da cólera, subunidades LT de E. coli lábeis ao calor, e subunidades B de enterotoxina LT-II, veratoxina, toxina pertussis, enterotoxina de C. jejuni, toxina Shiga, toxina de listeria, toxoide de tétano, toxoide de difteria, proteína de membrana externa N. meningitidis, proteína de revestimento bacteriófago, adenovírus e outras proteínas de revestimento viral. Alternativamente, um componente não próprio da proteína pode ser pequeno. No mínimo, a(s) não auto-sequência(s) deve compreender cerca de 9, 10, 11 ou mais aminoácidos de comprimento e incluir total ou parcialmente pelo menos um epítomo de célula T humana. Como aqui descrito, os polipeptídeos sintéticos não naturais (por exemplo, BVN22E) que podem ser usados cumprem os requisitos de conferir imunogenicidade a toda a proteína e permitir a apresentação apropriada de fatores de crescimento, receptores, antígenos tumorais ou epítomos destes ao sistema imunológico do hospedeiro.

[0066] De acordo com a descrição, as proteínas / moléculas sintéticas aqui fornecidas – fatores de crescimento ou partes deles, receptores celulares ou partes deles, ou antígenos tumorais ou partes deles – estão relacionados a uma ampla gama de vias celulares envolvidas em doenças crônicas, cânceres baseados em fator de crescimento ou receptor, e / ou tumores sólidos para utilização como antígenos tumorais dentro das ditas proteínas sintéticas. As proteínas estão na forma de proteínas / moléculas sintéticas e podem ser úteis no tratamento de doenças crônicas, por exemplo, câncer de mama, pulmão, bexiga, ovário, vulva, colônico, pulmonar, cérebro, colorretal, intestinal, cabeça

e pescoço, e esôfago. Como diferentes antígenos tumorais podem ser expressos e múltiplos receptores celulares e fatores de crescimento superexpressos nas ditas doenças, as proteínas descritas abaixo podem conter um ou mais antígenos tumorais diferentes, um ou mais receptores diferentes ou fatores de crescimento de uma ou várias vias celulares associadas à doença. Essas proteínas são chamadas multivalentes.

[0067] Em uma modalidade ilustrativa, é descrita uma proteína composta por proteínas / moléculas sintéticas homogêneas que expressam um ou mais domínios neutralizantes do fator de crescimento epidérmico (EGF) (por exemplo, domínios TSP). A proteína pode estar na forma de proteínas / moléculas sintéticas e pode ser útil no tratamento de doenças crônicas, por exemplo, câncer de mama, pulmão, bexiga, ovário, vulva, cólon, pulmão, cérebro, colorretal, cabeça e pescoço, e esôfago. Em uma modalidade ilustrativa, a proteína é uma proteína / molécula sintética que expressa ou inclui sequências sintéticas de EGF e sequências de CT-B, como mostrado na Figura 1A. Em uma modalidade ilustrativa, um componente de fator de crescimento da sequência de proteína sintética pode incluir uma sequência que é menos de 80% idêntica ao EGF. Por exemplo, um componente de fator de crescimento pode incluir uma sequência de EGF com 11 substituições de aminoácidos que podem aumentar a imunogenicidade da porção de fator de crescimento da sequência de proteína sintética. Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que a região do EGF que 'apresenta' ou restringe o loop ((por exemplo, a região definida por Cys6 a Cys31) pode ser uma importante inclusão na proteína sintética e passível de ser alvo de modificação de aminoácidos. Em uma modalidade ilustrativa, regiões fora de Cys6 a Cys31 também podem ser direcionadas para modificação (por exemplo, E11 e A12).

[0068] Em uma modalidade ilustrativa, os domínios TSP1 e TSP2

de hEGF podem ser modificados como mostrado na Figura 1B para criar regiões de EGF sintético (sEGF) a serem incluídas em uma proteína / molécula sintética neste documento.

[0069] Em uma modalidade ilustrativa, as proteínas / moléculas sintéticas aqui descritas podem incluir todos ou uma porção de fatores de crescimento, incluindo, sem limitação, fatores de crescimento, tal como, por exemplo, Neuregulina 1 $\beta$  (NRG1 $\beta$ ), Fator de Crescimento Transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), fator de crescimento Endotelial vascular (VEGF) e similares.

[0070] Em outras modalidades ilustrativas, as proteínas / moléculas sintéticas aqui descritas podem incluir um ou mais ligantes ou espaçadores. Uma ou mais das modalidades descritas acima incluem sEGF fundido a CT-B, de modo que a porção sEGF da molécula sintética seja separada da porção CT-B por um ligante GGSGG-TSGGGGGSG. Estas proteínas recombinantes ou quiméricas resultantes incluíram essencialmente sEGF fundido diretamente a CT-B. Em outras modalidades ilustrativas, os componentes EGF e CT-B da proteína quimérica são efetivamente separados por 3 a 14 aminoácidos, que formam um espaçador ou ligante flexível entre os dois domínios. É considerado dentro do escopo da descrição que o ligante pode ter 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 aminoácidos de comprimento. Em alguns casos em que um fator de crescimento tem um tamanho maior (por exemplo, fator de crescimento humano), pode ser útil usar uma sequência ligante mais longa. Os seguintes ligantes exemplificativos podem ser usados e incluem, mas não estão limitados aos seguintes: SSG, SSGGG, SGG, GSSG, GGSGG, GGGGS, SSGGGSGG, SSGGGGSGGG, TSGGGSG, TSGGGGSGG, SSGGGSGGSSG, GSGGGTSGGGGSG, SGGTSGGGGSGG, GGSGGTSGGGGSGG, SSGGGGSGGGSSG, SSGGGSGGSSGGG e SSGGGGSGGGSSGGG. Um versado na técnica apreciará que existem muitas outras sequências /

combinações principalmente de 'G' e 'S' que também serviriam como sequências ligantes úteis.

[0071] Sem estar limitado por nenhuma teoria em particular, é considerado que as proteínas / moléculas sintéticas descritas neste documento forneçam benefícios clínicos significativos. Por exemplo, as proteínas / moléculas sintéticas aqui descritas podem ser expressas em sistemas bacterianos em escala e pureza comerciais, enquanto produzem polipeptídeos estáveis que se dobram corretamente e são funcionais. Além disso, as proteínas / moléculas sintéticas aqui descritas são capazes de formar pentâmeros. Além disso, as proteínas / moléculas sintéticas aqui descritas têm a propriedade vantajosa de exigir níveis muito mais baixos de proteína para vacinação porque a quantidade de veículo necessária é significativamente menor do que os métodos da técnica anterior (por exemplo, Patente US No. 5.984.018 de Davila e outros). A este respeito, as proteínas / moléculas sintéticas aqui descritas são capazes de fornecer mais fator de crescimento a um paciente em um volume significativamente menor de vacina.

#### Adjuvante

[0072] Certas modalidades ilustrativas, conforme aqui fornecidas, incluem proteínas / moléculas sintéticas de acordo com a descrição nas composições de vacinas e composições de adjuvantes imunológicos, incluindo composições farmacêuticas, que contêm, além de proteínas / moléculas sintéticas, pelo menos um adjuvante, que se refere a um componente de tais composições que tem atividade adjuvante. Um adjuvante tendo essa atividade adjuvante inclui uma composição que, quando administrada a um indivíduo tal como um humano (por exemplo, um paciente humano), um primata não humano, um mamífero ou outro organismo eucariótico superior com um sistema imunológico reconhecido, é capaz de alterar (isto é, aumentar ou diminuir de uma maneira estatisticamente significativa e em certas modalidades prefe-

renciais, intensificar ou aumentar) a potência e / ou longevidade de uma resposta imune. Em certas modalidades ilustrativas descritas neste documento, um antígeno e / ou antígenos desejados contêm dentro um veículo de proteína e, opcionalmente, um ou mais adjuvantes, podem assim alterar, por exemplo, provocar ou aprimorar uma resposta imune que é direcionada contra o antígeno e / ou antígenos desejados que podem ser administrados ao mesmo tempo ou podem ser separados no tempo e / ou espaço (por exemplo, em um sítio anatômico diferente) em sua administração, mas certas modalidades ilustrativas não são destinadas a ser assim limitadas e, portanto, também consideram a administração de proteínas / moléculas sintéticas em uma composição que não inclui um antígeno especificado, mas que também pode incluir, mas não está limitado a, um ou mais coadjuvantes, um modificador da resposta imune imidazoquinolina.

[0073] Por conseguinte, e como observado acima, adjuvantes incluem composições que têm efeitos adjuvantes, tal como saponinas e miméticos de saponina, incluindo miméticos QS21 e QS21 (ver, por exemplo, Patente US. No. 5.057.540; EP 0 362 279 BI; WO 95/17210), alumínio, alcaloides vegetais tal como tomatina, detergentes tal como (mas não limitado a) saponina, polissorbato 80, Span 85 e estearil tirosina, uma ou mais citocinas (por exemplo, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-alfa, IFN-gama), um modificador de resposta imune imidazoquinolina e um modificador imune de haste – alça dupla (dSLIM, por exemplo, Weeratna e outros, 2005 Vaccine 23: 5263).

[0074] Os detergentes incluindo saponinas são descritos, por exemplo, na Patente No. 6.544.518; Lacaille-Dubois, M e Wagner H. (1996 Phytomedicine 2: 363 a 386), Patente 5.057.540, Kensil, Crit. Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1 a 55, e EP 0 362 279 BI. Estruturas particuladas, denominadas Complexos Imunoestimulantes (ISCOMS), compreendendo frações de Quil A (saponina), são hemolí-

ticas e foram utilizadas na fabricação de vacinas (Morein, B., EP 0 109 942 B I). Foi relatado que estas estruturas têm atividade adjuvante (EP 0 109 942 B 1; WO 96/1 1711). As saponinas hemolíticas QS21 e QS17 (frações de Quil A purificadas por HPLC) foram descritas como potentes adjuvantes sistêmicos, e o método de sua produção é descrito na Patente US 5.057.540 e EP 0 362 279 B1. Também descrito nessas referências é o uso de QS7 (uma fração não hemolítica de Quil-A), que atua como um potente adjuvante para vacinas sistêmicas. O uso de QS21 é ainda descrito por Kensil e outros (1991. J. Immunology 146: 431 a 437). Também são conhecidas combinações de QS21 e polissorbato ou ciclodextrina (WO 99/10008). Os sistemas adjuvantes particulados compreendendo frações de QuilA, tal como QS21 e QS7, são descritos nos documentos WO 96/33739 e WO 96/1 1711. Outras saponinas que foram usadas em estudos de vacinação sistêmica incluem aquelas derivadas de outras espécies vegetais, tal como Gypsophila e Saponaria ( Bomford e outros, Vaccine, 10 (9): 572 a 577, 1992). A escina é outro detergente relacionado às saponinas para uso nas composições adjuvantes das modalidades aqui descritas. A escina é descrito no índice Merck (12.a ed. Entrada 3737) como uma mistura de saponina que ocorre na semente do castanheiro, Aesculus hippocastaenum. O seu isolamento é descrito por cromatografia e purificação (Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)) e por resinas de troca iônica (Erbring e outros, Patente U.S. No. 3.238.190). As frações de escina (também conhecidas como aescina) foram purificadas e demonstraram ser biologicamente ativas (Yoshikawa M, e outros (Chem Pharm Bull (Tóquio), agosto de 1996; 44 (8): 1454 a 1464)). A digitonina é outro detergente, também sendo descrito no índice Merck (12ª Ed., Entrada 3204) como uma saponina, derivada das sementes de Digitalis purpurea e purificada de acordo com o procedimento descrito por Gisvold e outros, J. Am. Pharm. Assoc., 1934, 23, 664; e Ru-

benstroth-Bauer, *Physiol. Chem.*, 1955, 301, 621.

[0075] Outros adjuvantes ou coadjuvantes para uso de acordo com certas modalidades aqui descritas incluem um copolímero em bloco ou polímero biodegradável, que se refere a uma classe de compostos poliméricos com os quais os versados na técnica estão familiarizados. Exemplos de um copolímero em bloco ou polímero biodegradável que pode ser incluído em uma composição de vacina ou em um adjuvante imunológico incluem Pluronic.RTM. L121 (BASF Corp., Mount Olive, N. J.; ver, por exemplo, Yeh e outros, 1996 *Pharm. Res.* 13: 1693).

[0076] Certas modalidades ilustrativas adicionais consideram adjuvantes imunológicos que incluem, mas não estão limitados a, um óleo que, em algumas dessas modalidades, pode contribuir com atividade coadjuvante e, em outras modalidades, pode adicional ou alternativamente fornecer um veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável. Qualquer número de óleos adequados é conhecido e pode ser selecionado para inclusão em composições de vacina e composições adjuvantes imunológicas com base na presente descrição. Exemplos desses óleos, a título de ilustração e não de limitação, incluem esqualeno, esqualano, óleo mineral, óleo de oliva, colesterol, e um mono-oleato de manida.

[0077] Modificadores de resposta imune, tal como modificadores de resposta imune imidazoquinolina, também são conhecidos na técnica e também podem ser incluídos como adjuvantes ou coadjuvantes em certas modalidades presentemente descritas.

[0078] Como também observado acima, um tipo de adjuvante ou coadjuvante para uso em uma composição de vacina de acordo com a descrição pode ser os coadjuvantes de alumínio, que geralmente são chamados de "alúmen". Os coadjuvantes de alúmen são baseados no seguinte: oxi-hidróxido de alumínio; hidroxifosfato de alumínio; ou vá-

rios sais proprietários. Os coadjuvantes de alumínio são vantajosos porque têm um bom registro de segurança, aumentam as respostas de anticorpos, estabilizam antígenos, e são relativamente simples para a produção em larga escala. (Edelman 2002 Mol. Biotechnol. 21: 129 a 148; Edelman, R. 1980 Rev. Infect. Dis. 2: 370 a 383).

#### Composições Farmacêuticas

[0079] Em certas modalidades ilustrativas, a composição farmacêutica é uma composição de vacina que compreende as proteínas / moléculas sintéticas de acordo com a descrição e pode ainda compreender um ou mais componentes, conforme aqui fornecidos, que são selecionados a partir de agonista de TLR, coadjuvante (incluindo, por exemplo, uma citocina, um modificador de resposta imune imidazoquinolina e / ou um dSLIM) e similares e / ou um construto de expressão recombinante, em combinação com um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável.

[0080] Os veículos ilustrativos serão não tóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações usadas. Para vacinas compreendendo proteínas / moléculas sintéticas, serão administrados cerca de 0,01 µg / kg a cerca de 100 mg / kg de peso corporal, tipicamente por via intradérmica, subcutânea, intramuscular ou intravenosa, ou por outras vias.

[0081] Estará evidente para os versados na técnica que o número e a frequência da administração dependerão da resposta do hospedeiro. "Veículos farmacêuticamente aceitáveis" para uso terapêutico são bem conhecidos na técnica farmacêutica e são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit., 1985). Por exemplo, solução salina estéril e solução salina tamponada com fosfato em pH fisiológico pode ser usada. Conservantes, estabilizadores, corantes e até agentes flavorizantes podem ser fornecidos na composição farmacêutica. Por exemplo, benzoato de sódio, ácido ascórbico e ésteres de ácido p-hidroxibenzoico podem ser

adicionados como conservantes. Além disso, podem ser utilizados antioxidantes e agentes de suspensão.

[0082] As composições farmacêuticas podem estar em qualquer forma que permita que a composição seja administrada a um paciente. Por exemplo, a composição pode estar na forma de um sólido, líquido ou gás (aerossol). As vias de administração típicas incluem, sem limitação, via oral, tópica, parentérica (por exemplo, sublingual ou bucal), sublingual, retal, vaginal e intranasal (por exemplo, como uma aspersão). O termo parentérica, como aqui utilizado, inclui administração iontoforética sonoforética, transdérmica passiva, administração por microagulhas e também injeções subcutâneas, técnicas de injeção ou infusão intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intratecal, intrameatal, intrauretral. Em uma modalidade específica, uma composição como aqui descrita (incluindo vacina e composições de farmacêuticas) é administrada por via intradérmica por uma técnica selecionada a partir de iontoforese, microcavitação, sonoforese ou microagulhas.

[0083] A composição farmacêutica é formulada de modo a permitir que os ingredientes ativos nela contidos estejam biodisponíveis após a administração da composição a um paciente. As composições que serão administradas a um paciente assumem a forma de uma ou mais unidades de dosagem, onde, por exemplo, um comprimido pode ser uma unidade de dosagem única, e um recipiente de um ou mais compostos da invenção na forma de aerossol pode conter uma pluralidade de unidades de dosagem.

[0084] Para administração oral, um excipiente e / ou ligante pode estar presente. Exemplos são sacarose, caulim, glicerina, dextrinas de amido, alginato de sódio, carboximetil celulose e etil celulose. Podem estar presentes agentes corantes e / ou flavorizantes. Um invólucro de revestimento pode ser usado.

[0085] A composição pode estar na forma de um líquido, por exemplo, um elixir, xarope, solução, emulsão ou suspensão. O líquido pode ser para administração oral ou para administração por injeção, como dois exemplos. Quando destinadas à administração oral, as composições preferenciais contêm um ou mais agentes adoçantes, conservantes, corante e intensificadores de sabor. Em uma composição destinada a ser administrada por injeção, um ou mais de um tensoativo, conservante, agente umectante, agente dispersante, agentes de suspensão, tampão, estabilizador e agente isotônico podem ser incluídos.

[0086] Uma composição farmacêutica líquida como aqui utilizada, seja na forma de uma solução, suspensão ou outra forma semelhante, pode incluir um ou mais dos seguintes veículos ou excipientes: diluentes estéreis, tal como água para injeção, solução salina, preferencialmente solução salina fisiológica, solução de Ringer, cloreto de sódio isotônico, óleos fixos tal como esqualeno, esqualano, óleo mineral, um mono-oleato de manida, colesterol e / ou mono- ou diglicerídeos sintéticos que podem servir como solvente ou meio de suspensão, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes; agentes antibacterianos tal como benzil álcool ou metil parabeno; antioxidantes tal como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tal como ácido etilenodiaminotetracético; tampões tal como acetatos, citratos ou fosfatos, e agentes para o ajuste da tonicidade tal como cloreto de sódio ou dextrose. A preparação parentérica pode ser colocada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos para doses múltiplas de vidro ou plástico. Uma composição farmacêutica injetável é de preferência estéril.

[0087] Em uma modalidade particular, uma composição farmacêutica ou de vacina da invenção compreende uma suspensão aquosa estável de menos de 0,2 um e compreende ainda pelo menos um

componente selecionado a partir do grupo que consiste de fosfolípidios, ácidos graxos, tensoativos, detergentes, saponinas, lipídios fluorados, e similar.

[0088] Também pode ser desejável incluir outros componentes em uma composição farmacêutica ou de vacina, tal como veículos de entrega, incluindo, entre outros, sais de alumínio, emulsões de água em óleo, veículos de óleo biodegradável, emulsões de óleo em água, microcápsulas biodegradáveis, e lipossomas. Exemplos de substâncias imunostimuladoras adicionais (coadjuvantes) para uso em tais veículos também são descritos acima e podem incluir N-acetilmuramyl-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), glucano, IL-12, GM-CSF, interferon gama e IL-12.

[0089] Embora qualquer veículo adequado conhecido dos versados na técnica possa ser usado nas composições farmacêuticas desta invenção, o tipo de veículo variará dependendo do modo de administração e se é desejada uma liberação sustentada. Para administração parentérica, tal como injeção subcutânea, o veículo compreende de preferência água, solução salina, álcool, gordura, cera ou tampão. Para administração oral, qualquer um dos veículos acima ou um veículo sólido, tal como manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, talco, celulose, glicose, sacarose e carbonato de magnésio, pode ser usado. As microesferas biodegradáveis (por exemplo, galactídeo polilático) também podem ser empregues como veículos para as composições farmacêuticas desta invenção.

[0090] As composições farmacêuticas também podem conter diluentes, tal como tampões, antioxidantes tal como ácido ascórbico, polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos), proteínas, aminoácidos, carboidratos incluindo glicose, sacarose ou dextrinas, agentes quelantes tal como EDTA, glutathione e outros estabilizadores e excipientes. Solução salina tamponada neutra ou solução

salina misturada com albumina sérica inespecífica são exemplos de diluentes apropriados. De preferência, o produto pode ser formulado como um liofilizado utilizando soluções de excipiente apropriadas (por exemplo, sacarose) como diluentes.

[0091] Em uma modalidade ilustrativa, o domínio de suporte do epítopo ou receptor da proteína / molécula sintética, derivado de uma sequência polipeptídica natural ou sintética, deve ter a capacidade de se automontar em multímeros oligoméricos em condições químicas / ambientais apropriadas ou ser reduzido a monômeros sob condições alternativas. Idealmente, os domínios de multimerização se montarão em multímeros estáveis com um número discreto de subunidades, por exemplo, dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros, etc., de modo que um produto de tamanho homogêneo seja gerado. Exemplos de polipeptídeos naturais incluem, entre outros, zíperes de leucina, proteína repressora de lac, estreptavidina / avidina, subunidade da toxina B da cólera, domínio de trimerização de Pseudomonas, e proteínas do capsídeo viral.

[0092] Em uma modalidade ilustrativa, é descrito um processo de preparação de uma molécula multivalente. Nesta modalidade ilustrativa, o processo inclui a montagem de multímeros a partir de subunidades monoméricas para formar uma proteína sintética incluindo um ou mais antígenos tumorais, receptores e / ou fatores de crescimento ou partes deles.

[0093] Em outra modalidade ilustrativa, é descrito um processo de preparação de uma formulação de vacina. Nesta modalidade ilustrativa, o processo inclui misturar um ou mais multímeros monovalentes únicos juntos, preparando uma vacina multivalente incluindo uma proteína / molécula sintética, incluindo um ou mais antígenos tumorais, receptores e / ou fatores de crescimento ou partes deles.

[0094] Em ainda outra modalidade ilustrativa, é descrito um pro-

cesso para o tratamento de um paciente. Nesta modalidade ilustrativa, o processo inclui administrar separadamente ao paciente uma ou mais proteínas recombinantes monovalentes, um antígeno tumoral, receptor e / ou fator de crescimento, no mesmo dia ou em dias ou horários alternados durante um período de vacinação.

[0095] Embora a proteína / molécula sintética seja descrita como incluindo ou expressando um ou mais de todos ou uma porção de pelo menos uma sequência dos antígenos tumorais, os fatores de crescimento e / ou os receptores, e a sequência CT-B, a proteína / molécula sintética pode incluir a sequência CT-B natural ou uma sequência substancialmente semelhante à sequência CT-B natural e / ou uma sequência sintética. Embora a proteína / molécula sintética seja descrita como incluindo ou expressando a sequência CT-B, a proteína / molécula sintética pode incluir ou expressar uma derivação da sequência CT-B ou uma sequência que é substancialmente semelhante à sequência CT-B.

[0096] Embora as proteínas / moléculas sintéticas homogêneas que expressam ou incorporem um ou mais antígenos tumorais, fatores de crescimento sintéticos e / ou receptores tenham sido descritas e ilustradas em conjunto com certas modalidades, muitas variações e modificações serão evidentes para os versados na técnica e podem ser feitas sem abandonar o espírito e o escopo da descrição. A descrição não deve, portanto, estar limitada aos detalhes precisos da metodologia ou construção estabelecidos acima, pois essas variações e modificações devem ser incluídas no escopo da descrição.

### EXEMPLOS

[0097] A presente descrição é ainda ilustrada pelos exemplos a seguir, que não deve ser interpretada como limitante. O conteúdo de todas as referências, números de acesso ao GenBank e Gene, e patentes publicadas e pedidos de patentes citadas ao longo do pedido

são aqui incorporados por referência. Os versados na técnica reconhecerão que a descrição pode ser praticada com variações nas estruturas, materiais, composições e métodos descritos, e essas variações são consideradas como dentro do escopo da descrição.

Exemplo 1: Protocolo de imunização com BVN22E

[0098] O BVN22E foi expresso no citoplasma de 500 mililitros (ml) de células BL21 pLys6 como corpos de inclusão usando protocolos padrão. Os corpos de exclusão foram isolados por centrifugação, lavados e solubilizados em 10 ml de Ureia a 8M e DTT a 2 mM. Um mililitro da solução de proteína foi dobrado novamente por diluição por gotejamento em 100 ml de tampão Tris-HCl a 50 mM, Ureia a 2 M, DTT a 1 mM pH 7,4 contendo um tampão redox (GSH / GSSG) durante um período de 1 hora. A proteína foi armazenada a 4°C para permitir que a dobragem continuasse.

[0099] A proteína largamente dobrada foi trocada por tampão em Trsi-HCl a 50 mM pH 8,0 por diálise e depois purificada por cromatografia de troca iônica (IEX) em uma coluna HP Q 'Hitrap'. A fração que equivale ao BVN22E eluído foi isolada por eluição por etapas, e posteriormente purificada em uma coluna de exclusão de tamanho Sephadex 75 para separar a proteína pentamérica de outros estados oligoméricos. Esta foi depois purificada para remover a endotoxina usando metodologias padrão.

[00100] A proteína foi imunizada em coelhos (n = 5) a 100 µg / injeção na injeção completa de Freund (somente injeção primária) ou incompleta de Freund (injeções de reforço) usando o seguinte escalonamento:

Dia 0	Pré-sangramento
Dia 0	Imunização
Semana 4	Reforço 1
Semana 6	Sangramento de teste 1

Semana 8	Reforço 2
Semana 9	Sangramento de teste 2
Semana 12	Reforço 3
Semana 13	Sangramento final

[00101] Os soros de coelhos individuais foram purificados por precipitação padrão de ácido caprílico para isolar a fração de IgG, e os anticorpos purificados foram ou reunidos ou analisados individualmente.

#### Exemplo 2: Ensaio ELISA de ligação

[00102] As placas foram revestidas por 1 hora em temperatura ambiente com 100 µl de rhEGF a 1 µg / ml, lavadas x3 com PBS e bloqueadas com 200 µl / poço de BSA a 2% por 2 horas. As placas foram lavadas como descrito e 200 µl / poço de IgG purificada foram adicionados ao primeiro poço. Cem microlitros a partir dos primeiros poços foram pipetados em 100 µl de PBS em poços adjacentes, e duas diluições em série foram feitas através da placa. As placas foram incubadas em temperatura ambiente durante 1 hora e lavadas como antes. O anticorpo secundário anticoelho marcado com HRP foi adicionado conforme prescrito e incubado por 1 hora em temperatura ambiente antes da lavagem com PBS-tween. Cem microlitros / poço de substrato TMB foram adicionados, e incubados até a cor se desenvolver. As reações foram paradas com 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1 M e as placas foram lidas a 450 nm.

[00103] Como mostrado na Figura 2, a titulação da fração de IgG purificada de cada um dos cinco coelhos imunizados no ensaio de ligação a rhEGF foi aproximadamente consistente ao longo do intervalo de diluição em série de 1.000 a 1.000.000 vezes, indicando uma forte resposta imune ao BVN22E em cada um dos coelhos imunizados.

[00104] Para testar a especificidade e a sensibilidade da resposta imune de BVN22E, as frações de IgG purificadas de cada um dos cin-

co coelhos foram reunidas e comparadas no ensaio de ligação a rhEGF às frações de IgG purificadas de um grupo de cinco que foram imunizados com uma proteína equivalente contendo dois domínios nativos de EGF (sequência inferior na Figura 1B).

Exemplo 3: Ensaio de fosforilação de EGFR A431 (sinalização de EGF)

[00105] As células A431 foram cultivadas com confluência de 50% em frascos de cultura T75 sob condições padrão em DMEM suplementado com FBS a 10%. As células foram lavadas por pipetagem do meio e adicionando 10 ml de PBS pré-aquecido. Este foi então removido e foram adicionados 2 ml de tripsina. O frasco foi incubado por 20 minutos (ou mais, se necessário) para permitir que as células se separassem do balão. Dez mililitros de DMEM fresco foram adicionados ao frasco, e as células foram então transferidas para um tubo 'Falcon' de 50 ml. As células foram peletizadas suavemente a 250 x g por 10 minutos, o sobrenadante decantado para remover a tripsina, e as células foram então ressuspensas em 10 ml de DMEM fresco.

[00106] Duzentos microlitros de células foram pipetados em cada poço da placa de 96 poços, que foi então incubada durante a noite para permitir que as células aderissem à placa. No dia seguinte, todos os poços foram lavados uma vez com PBS, e foi adicionado meio fresco sem soro. As placas foram então incubadas por outro dia / durante a noite para permitir que um nível basal de fosforilação de EGF-R se estabelecesse.

[00107] Para analisar as células, o meio foi removida, e um dos seguintes foi adicionado:

- i) 100 µl de meio sem soro fresco (ativação basal de EGF-R);
- ii) 100 µl de SFM + rhEGF a 30 ng / ml (controle de ativação do EGF-R);

iii) 100 µl de SFM + anticorpo de controle (neutralizante) na concentração desejada (5 µg / ml); ou

iv) 100 µl de SFM + anticorpo na concentração desejada +/- rhEGF a 30 ng / ml.

[00108] Para poços que exigem rhEGF e anticorpo (controle ou amostra), foram preparados 500 mL de reação em tubos Eppendorf e pré-incubados por 1 hora a 37°C. Cem microlitros foram então aplicados às células A431 como acima.

[00109] Em todos os ensaios, foram preparados poços quadruplicados. As células foram incubadas com o meio de reação por 60 minutos a 37°C em CO<sub>2</sub> a 5%.

[00110] Após o tempo de incubação, o meio foi removido por pipetagem e foram adicionados 40 µl de tampão de lise (ureia a 6M, TrisHCl a 50M pH7,9, SDS a 2%, beta-mercaptoetanol a 5%) por poço adicionado. A placa foi incubada por 10 minutos na bancada para lisar as células. As reações de 4 poços replicados para cada amostra foram pipetadas suavemente para cima e para baixo, raspando o fundo do poço para liberar todo o lisado, e transferidas para um tubo Eppendorf fresco. Vinte microlitros de corante de carga foram adicionados a cada tubo, e os tubos foram fervidos por 10 minutos seguidos de centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima.

[00111] As amostras foram usadas diretamente para Western blots ou armazenadas a 4°C até serem necessárias.

[00112] Os Westerns blots foram realizados em duplicado, com uma membrana sendo sondada com anticorpo anti-EGFR de coelho (Abcam ab52894) para normalizar os níveis de expressão de receptor entre amostras, e a segunda com anticorpo de coelho específico para EGFR fosforilado (Abcam ab32578) para avaliar os níveis de ativação de receptor. Ambas foram desenvolvidas com anticorpo anticoelho marcado com HRP (Abcam ab97051).

[00113] Como mostrado nas Figuras 4A-4B, BVN22E é capaz de estimular a fosforilação de EGFR em células A431. Em particular, a Figura 4A mostra um Western blot ilustrando que BVN22E é capaz de estimular a fosforilação do EGFR de células A431 na mesma extensão que uma molécula semelhante contendo domínios nativos de EGF humano, e que essa estimulação ocorre de maneira concentração-dependente. A Figura 4B mostra os resultados de um ensaio semelhante, mas sem comparação com uma molécula baseada em EGF.

[00114] Os anticorpos anti-BVN22E são capazes de neutralizar a ativação de EGFR. Como mostrado na Figura 5, IgG combinada purificada de 5 coelhos imunizados com BVN22E em duas concentrações é capaz de neutralizar a ativação de EGFR de células A431 por 30 ng / ml de rhEGF de maneira semelhante a um anticorpo monoclonal neutralizante comercialmente disponível (por exemplo, anticorpo monoclonal 10825 da R&D Systems). A Figura 6 mostra que os soros individuais de cada um dos 5 coelhos imunizados com BVN22E são capazes de neutralizar a ativação de EGFR das células A431 por 30 ng / ml de rhEGF de maneira semelhante a um anticorpo monoclonal neutralizante comercialmente disponível.

[00115] Os anticorpos anti-BVN22E são capazes de neutralizar a ativação de EGFR mesmo após apenas uma injeção de reforço. Por exemplo, a Figura 7 mostra que os soros reunidos de coelhos submetidos à imunização com BVN22E foram capazes de neutralizar a sinalização de EGFR a partir de 30 ng / ml de rhEGF em células A431 após apenas uma injeção de reforço (teste de sangramento 1) tão eficazmente quanto um anticorpo monoclonal neutralizante (por exemplo, anticorpo monoclonal R&D Systems 10825). Os soros de animais antes da imunização não tinham atividade neutralizante (pista 5).

[00116] Além disso, os anticorpos anti-BVN22E são bastante eficazes na neutralização da ativação de EGFR. Por exemplo, a Figura 8

mostra que a atividade neutralizante de IgG anti-BVN22E é semelhante à de IgG purificada de animais imunizados com uma molécula comparável, incluindo apenas domínios nativos de EGF e com a seguinte sequência:

```
NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELRGSSGNSDSECPLSHD
GYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELRGGSGGTSGGGGGSGTTPQNITDLCAEY
HNTQIHITLNDKIFSYTESLADKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEA
KVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN.
```

**Exemplo 4:** Comparação da potência de BVN22E com imunogene nativo baseado em hEGF

[00117] O BVN22E foi expresso e purificado como descrito no Exemplo 1 acima. O imunogene nativo baseado em EGF foi preparado por ligação cruzada química de rhEGF com uma proteína bacteriana imunogênica de tamanho similar aos pentâmeros de CTB.

[00118] As proteínas foram imunizadas em camundongos (n = 10) a 30 µg / injeção na injeção completa de Freund (somente injeção primária) ou incompleta de Freund (injeção de reforço) usando o seguinte escalonamento:

Dia 0	Pré-sangramento
Dia 0	Imunização
Dia 14	Sangramento 2
Dia 14	Reforço
Dia 28	Sangramento 3

[00119] Os soros de cada grupo de 10 camundongos foram reunidos e utilizados em três concentrações diferentes para avaliar a fosforilação / inibição da fosforilação de células A431 por rhEGF exatamente como descrito no Exemplo 3 acima.

[00120] A Figura 9 mostra que os soros gerados por ambos os imunogenes foram capazes de provocar uma resposta imune que incluía anticorpos capazes de bloquear a via de sinalização de EGF. Também pode ser observado, ao comparar a pista 4 com 7, e a pista 5 com 8,

que o soro anti-BVN22E tem uma atividade neutralizante maior que os antissoros para o imunogene contendo EGF nativo.

Exemplo 5: Neuregulina 1  $\beta$  sintética estável pode ser produzida por sistemas de expressão bacteriana

[00121] As moléculas à base de neuregulina 1 $\beta$  (NRG1 $\beta$ ) provaram ser muito difíceis de produzir e usar. Por exemplo, é muito difícil produzir NRG1 $\beta$  funcional em E. coli porque essa NRG1 $\beta$  gerada por bactérias é produzida com rendimentos muito baixos, é indesejavelmente glicosilada, e é incapaz de se dobrar em uma forma funcionalmente ativa. Além disso, a proteína NRG1 $\beta$  produzida bacterianamente não é estável. Por exemplo, a Neuregulina de ocorrência natural nativa é naturalmente muito instável, e o material adquirido comercialmente tem uma vida útil de apenas um mês a -80° C.

[00122] NRG1 $\beta$  inclui a seguinte sequência:

GTSHLVKcAEKEKTFcVNGGECFMVKDLSNPSRYLcKcPNEFTGDRcQNYVMASF

[00123] A porção equivalente de BVN22E inclui a seguinte sequência:

NTENDcPLSHEAYcLHDGVcMYIEALDKYAcNcVVGyVGERcQFRDLRWWDAR

[00124] Para testar se porções da sequência de BVN22E poderiam exercer efeitos positivos no rendimento, estabilidade e função do polipeptídeo NRG1 $\beta$ , regiões de NRG1 $\beta$  entre os resíduos de cisteína (letras minúsculas) foram sistematicamente substituídas pelas regiões equivalentes do polipeptídeo BVN22E. Surpreendentemente, a porção de BVN22E localizada entre a primeira e a segunda cisteína (por exemplo, PLSHEAY) teve um impacto benéfico quando incorporada na posição análoga com NRG1 $\beta$ , enquanto as regiões entre os resíduos de cisteína restantes não. Esta sequência polipeptídica "sintética" híbrida é chamada de um polipeptídeo híbrido NRG-BVN e tem a seguinte sequência:

[00125] Polipeptídeo híbrido NRG-BVN (SEQ ID NO: 11)

GTSHLVKcPLSHEAYcVNGGECFMVKDLSNPSRYLcKcPNEFTGDRcQNYVMASF

[00126] O polipeptídeo híbrido NRG-BVN pode ser expresso em *E. coli* como uma proteína dobrada e purificada em uma versão modificada (mas ainda muito semelhante) do processo de purificação de BVN22E como pentâmero. A sequência de NRG-BVN também pode ser expressa em uma forma solúvel dobrada em uma cepa apropriada de *E. coli*, embora com menor rendimento.

[00127] Como mostrado nas Figuras 10 e 11, as bandas em um Western Blot refletem a capacidade do anticorpo anti-NRG de reconhecer vários estados de proteína.

[00128] A Figura 12 mostra um ensaio de ativação de células MCF-7 em que o painel superior mostra a ativação (por exemplo, fosforilação) do receptor ERB3 por rhNRG-1 $\beta$  (pista 2), a molécula sintética de NRG-CTB (pista 4), e a inibição de ambos com um anticorpo neutralizante (Pistas 3 e 5). O painel inferior é um controle para a expressão do receptor ERB3. Estes dados mostram que o polipeptídeo híbrido sintético NRG-BVN mostra estabilidade significativa (por exemplo, não houve degradação visível após > 1 mês). Além disso, o polipeptídeo híbrido NRG-BVN também não se liga ao EGFR (ERB1), o receptor natural de EGF.

Exemplo 6: TGF $\beta$  sintético estável pode ser produzido por sistemas de expressão bacteriana

[00129] As moléculas baseadas em TGF $\alpha$  também têm sido problemáticas para produzir em sistemas de expressão bacteriana. Por exemplo, um problema principal das moléculas baseadas em TGF $\alpha$  é que, embora possam ser expressas em sistemas bacterianos para produzir uma proteína dobrada, a proteína resultante também é altamente lábil e sujeita a desdobração.

[00130] Para testar se porções da sequência de BVN22E poderiam exercer efeitos positivos sobre a labilidade e a função de um polipeptídeo baseado em TGF $\alpha$ , regiões de TGF $\alpha$  entre os resíduos de cisteína

foram sistematicamente substituídas pelas regiões equivalentes do polipeptídeo BVN22E. As moléculas sintéticas foram projetadas e fabricadas usando modelagem computacional e informações estruturais conhecidas para prever / identificar regiões importantes de ligação ao receptor. Em contraste com o polipeptídeo híbrido NRG-BVN, a molécula de TGF $\alpha$  sintética contém apenas a sequência de TGF $\alpha$  encontrada da cisteína 3 a 5 (por exemplo, RFLVQEDKPAcV). Essa região incluiu a 'alça B'. Esta sequência polipeptídica "sintética" híbrida é chamada de polipeptídeo híbrido de TGF $\alpha$  e tem a seguinte sequência:

[00131] Polipeptídeo híbrido de TGF $\alpha$  (SEQ ID NO: 12)

NTENDcPLSHEAYcLHDGVcRFLVQEDKPAcVcVVGyVGERcQFRDLRWWDAR

[00132] Como mostrado nas Figuras 13A-13C, o polipeptídeo híbrido de TGF $\alpha$  pode ser expresso, dobrado e purificado de uma maneira muito semelhante a BVN22E. Esta figura mostra um gel SDS da molécula de TGF $\alpha$  sintética (Figura 13A) que é reconhecido por 2 anticorpos neutralizantes anti-TGF $\alpha$  diferentes (Figura 13B), mas não por nenhum dos dois anticorpos anti-EGF diferentes (Figura 13C).

[00133] Adicionalmente, o polipeptídeo híbrido de TGF $\alpha$  forma pentâmeros e alguns outros oligômeros que são removidos durante a purificação. Como mostrado na Figura 14, após purificação, é visível uma única banda de pentâmero nos géis Blue nativos.

[00134] Como mostrado nas Figuras 15A e 15B, o polipeptídeo híbrido de TGF $\alpha$  também mostra estabilidade melhorada, permanecendo como pentâmero nítido após > 3 semanas em temperaturas elevadas em um estudo de estabilidade acelerada.

#### INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[00135] Todos os documentos citados ou referenciados aqui e todos os documentos citados ou referenciados nos documentos aqui citados, juntamente com as instruções do fabricante, descrições, especificações do produto, e fichas do produto para quaisquer produtos mencionados neste documento ou em qualquer documento incorpora-

do por referência aqui, são incorporados por referência e podem ser empregues na prática da descrição.

### EQUIVALENTES

[00136] Entende-se que os exemplos e modalidades detalhados descritos neste documento são dados a título de exemplo apenas para fins ilustrativos e não são de forma alguma considerados limitantes da descrição. Várias modificações ou alterações serão sugeridas a pessoas versadas na técnica e estão incluídas no espírito e alcance deste pedido e são consideradas dentro do escopo das reivindicações em anexo. Características e funcionalidades vantajosas adicionais associadas aos sistemas, métodos e processos da presente descrição serão evidentes a partir das reivindicações em anexo. Além disso, aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar, usando não mais que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da descrição aqui descrita. Tais equivalentes devem ser abrangidos pelas reivindicações a seguir.









ção 16, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um adjuvante.

32. Método para tratar um paciente em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende:

administrar ao paciente a composição imunogênica como definida na reivindicação 16 no mesmo dia ou em dias ou horários alternados durante um período de vacinação.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de que o paciente tem um câncer.

34. Proteína sintética, caracterizada pelo fato de que compreende:

uma sequência de Neuregulina 1 $\beta$  (NRG1 $\beta$ ) sintética ou uma sequência do Fator de Crescimento Transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) sintético;

pelo menos um ligante, e  
uma sequência polipeptídica.

35. Proteína sintética, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que a sequência polipeptídica inclui uma sequência polipeptídica imunogênica.

36. Proteína sintética, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que a sequência polipeptídica inclui uma proteína da toxina B da cólera (CT-B).

37. Proteína sintética, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que pelo menos um ligante inclui um primeiro ligante que separa o fator de crescimento sintético da sequência polipeptídica.

38. Proteína sintética, de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que o primeiro ligante é selecionado a partir do grupo que consiste de SSG, GSSG, SSGGG, SGG, GGSSG, GGGGS, SSGGGSSG, SSGGGGSSGG, TSGGGSG, TSGGGGSSG





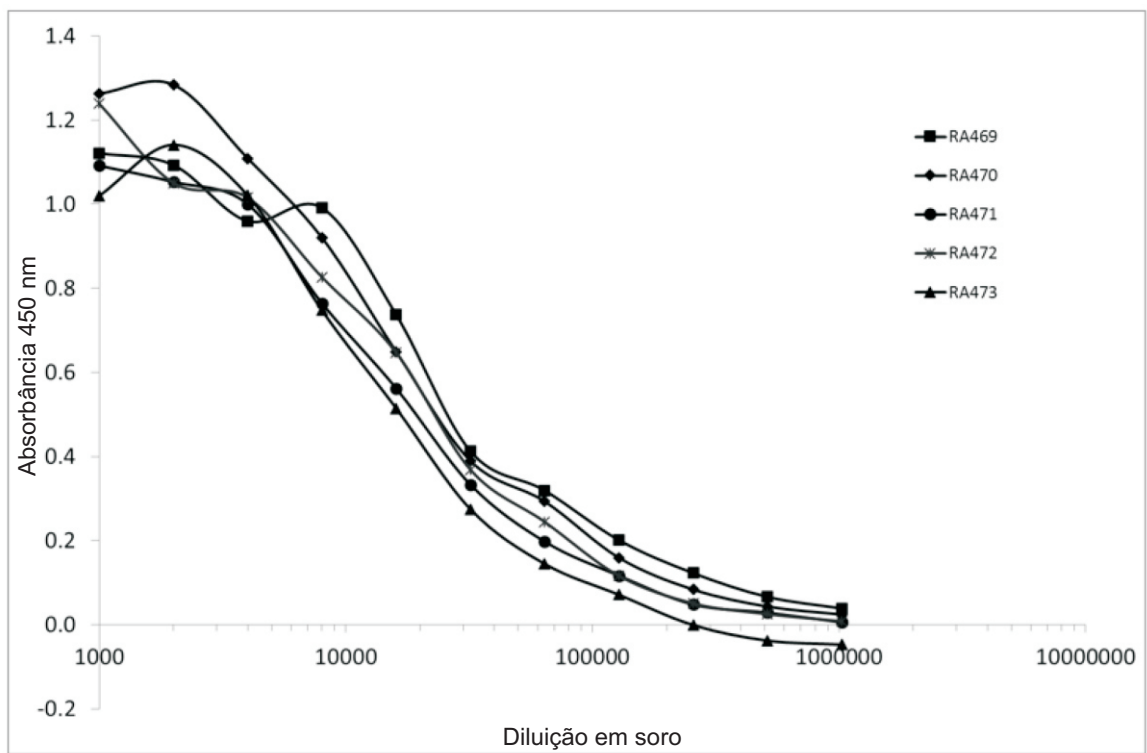


FIG. 2

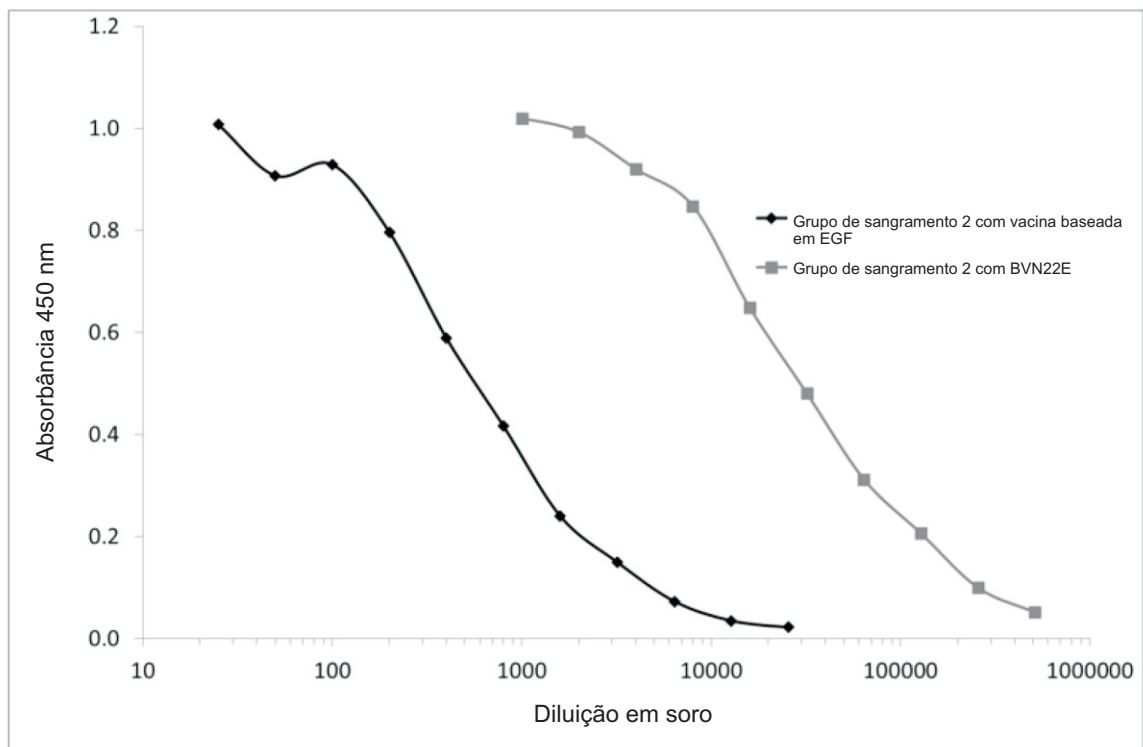


FIG. 3

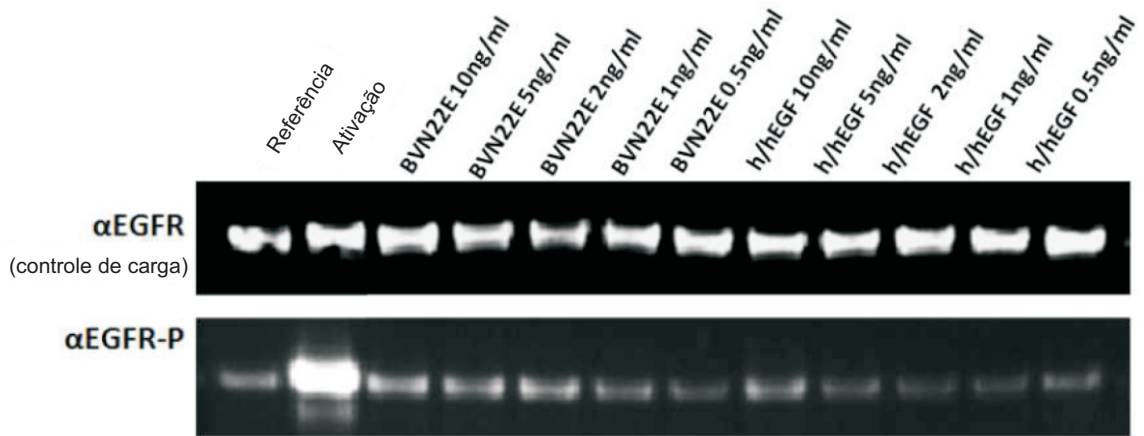
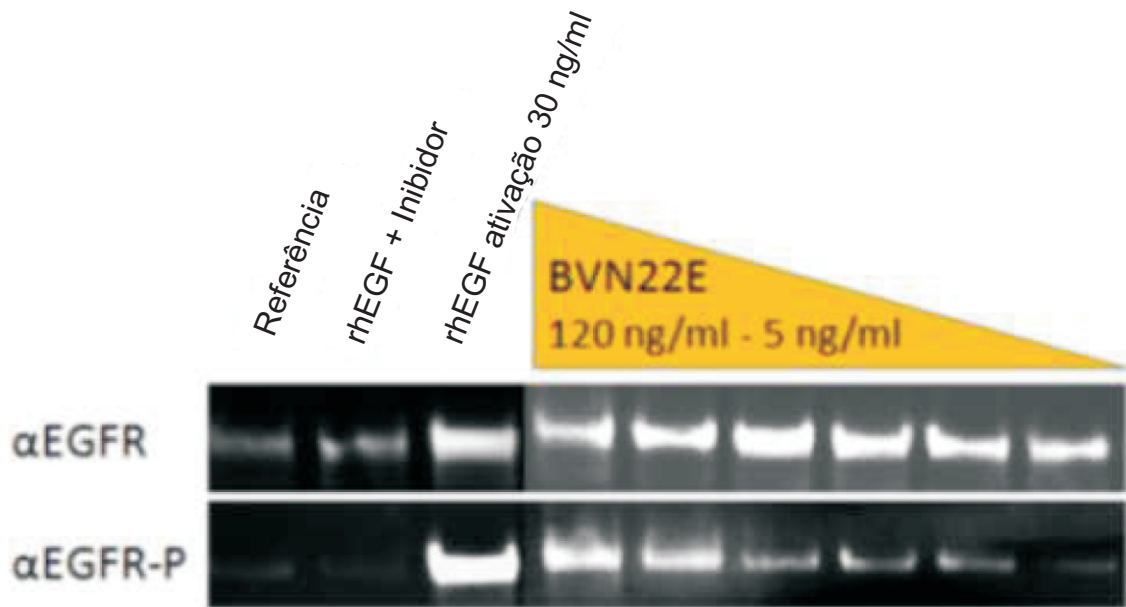


FIG. 4A



**FIG. 4B**

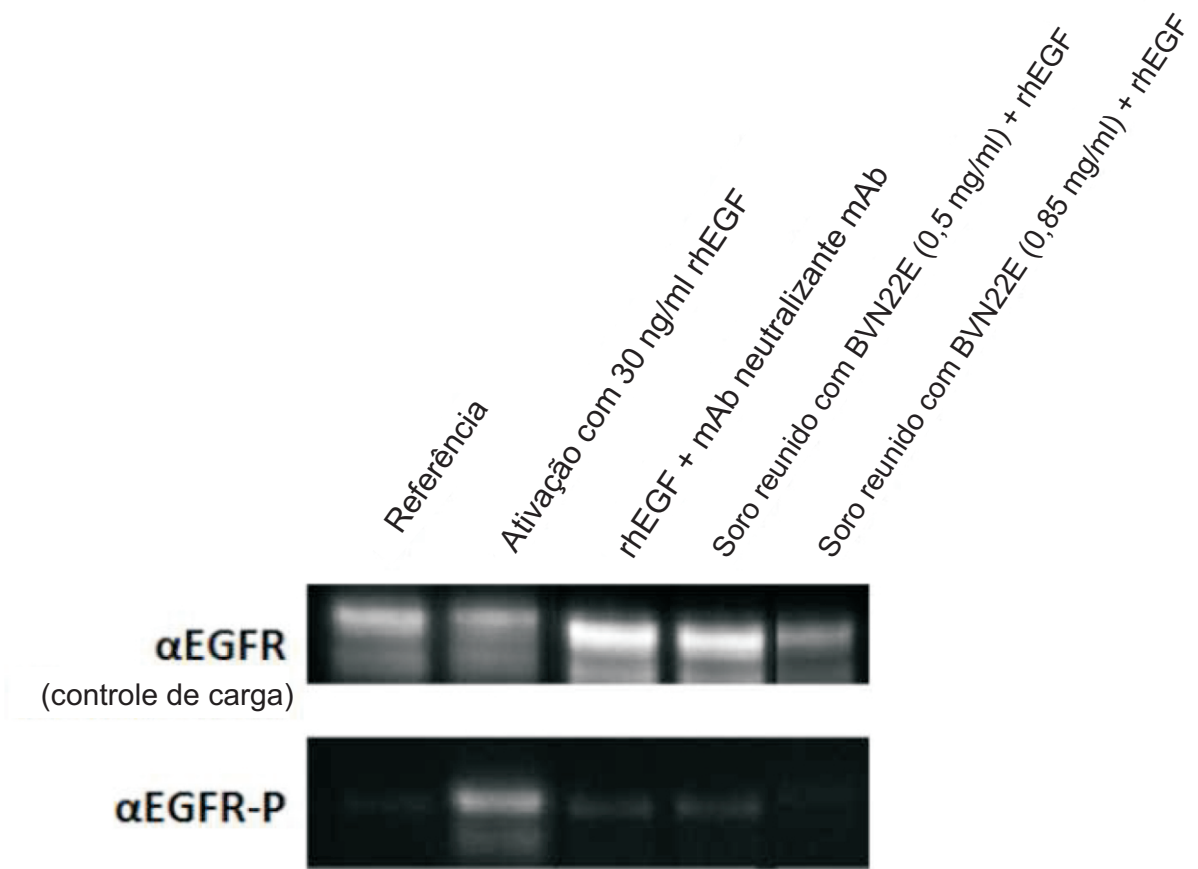


FIG. 5

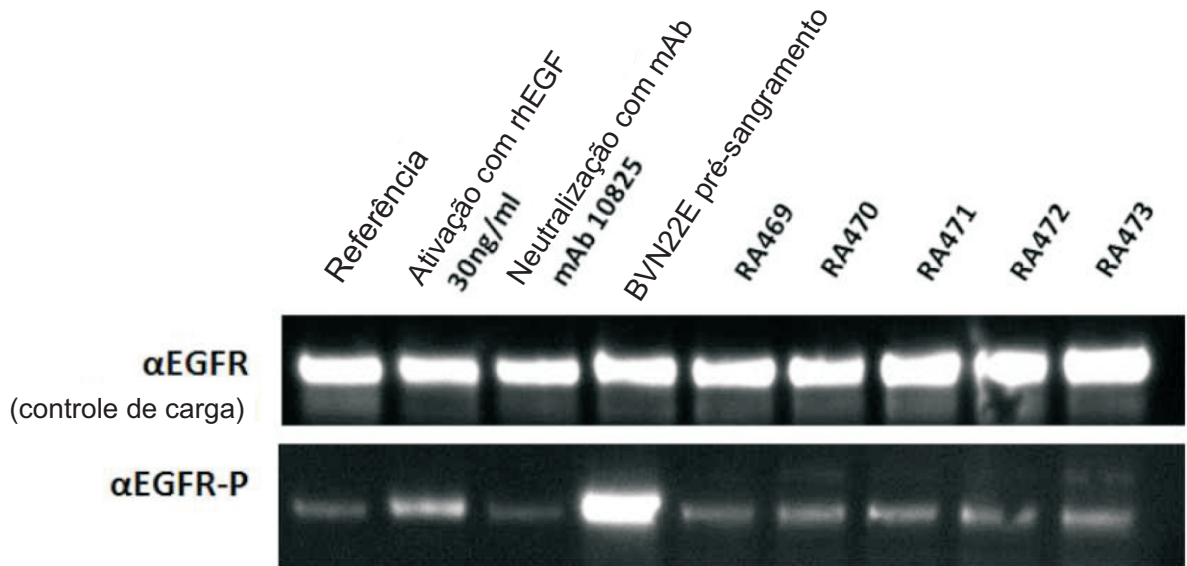


FIG. 6

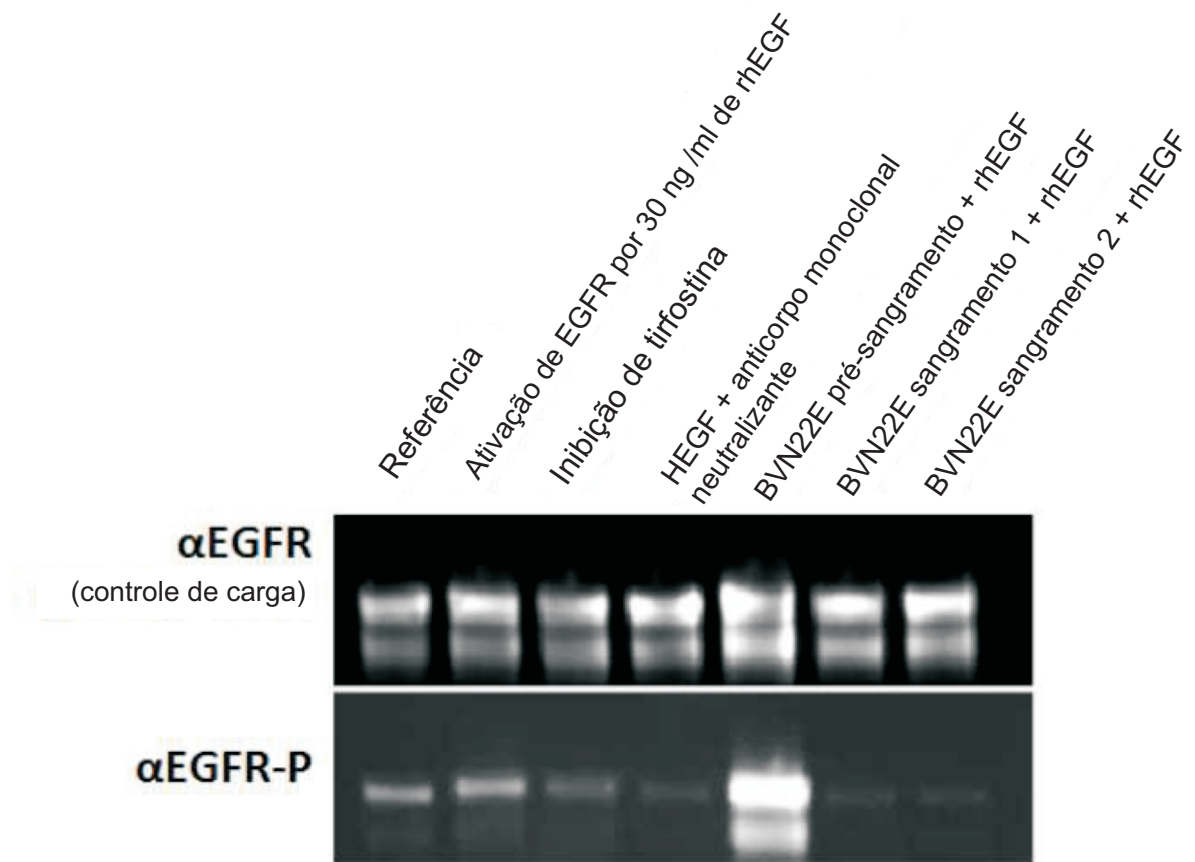


FIG. 7

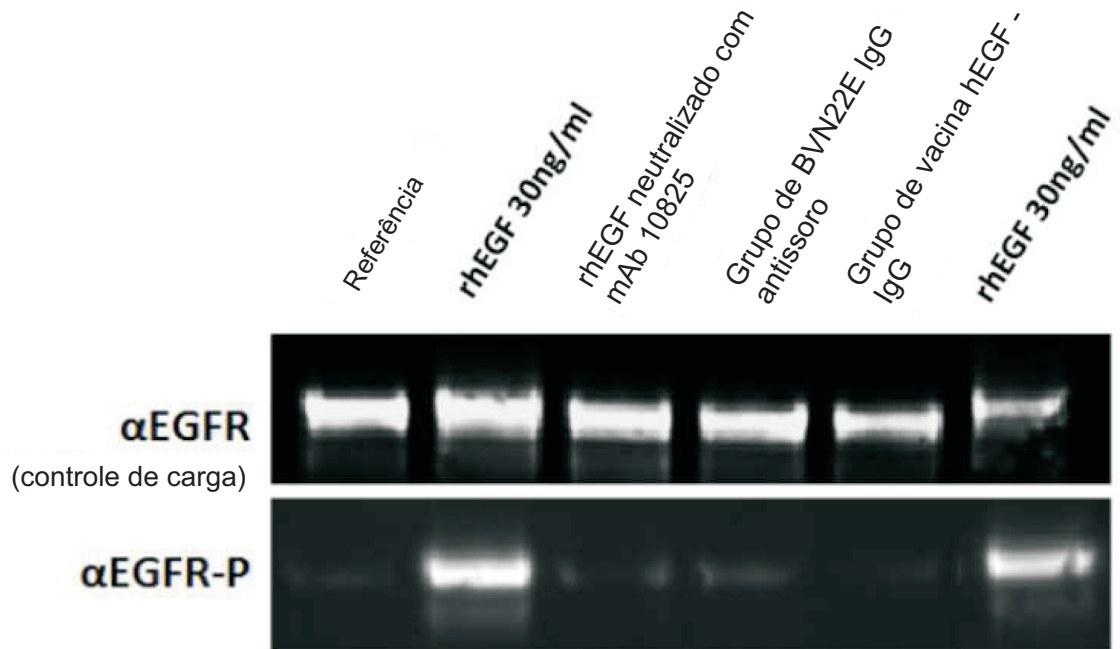
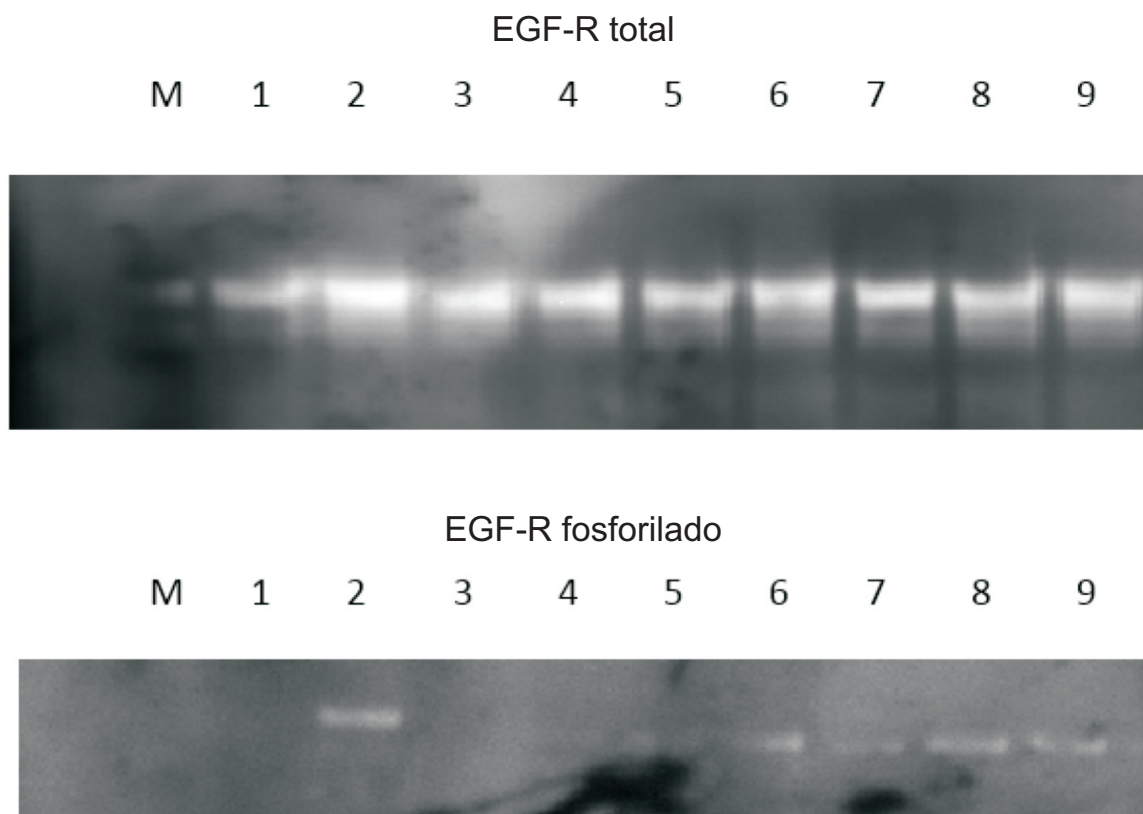


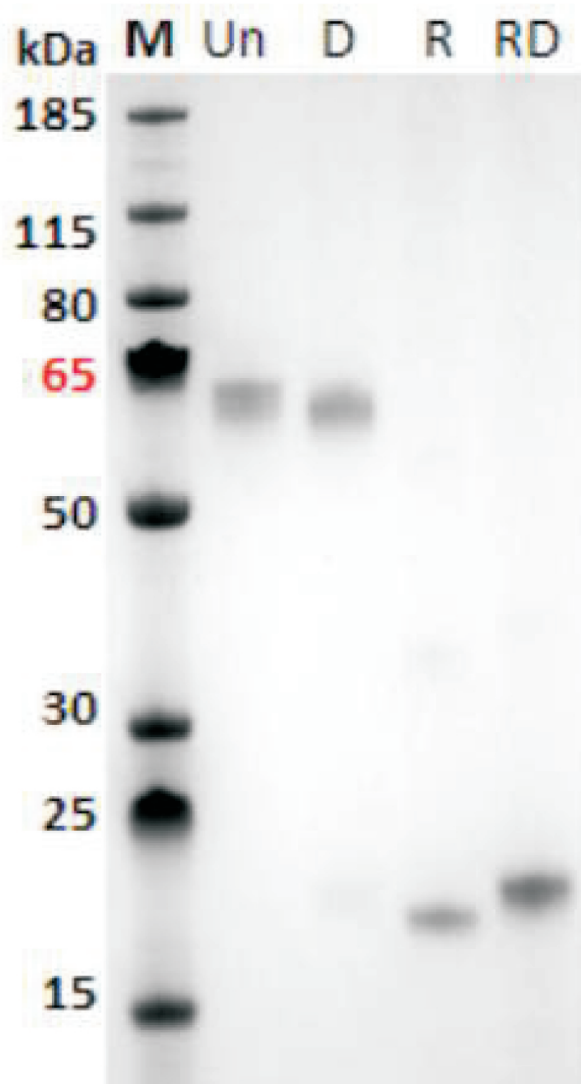
FIG. 8

10/19



Pista:    **M**    Marcador  
1 Célula somente controle (sem ativação)  
2 Controle +ve (ativado com 30 ng / ml de rhEGF)  
3 Controle -ve (rhEGF + mAb neutralizante)  
4 30 ng / ml de rhEGF + BVN22E soro @ 1/10  
5 30 ng / ml de rhEGF + BVN22E soro @ 1/100  
6 30 ng / ml de rhEGF + BVN22E soro @ 1/1000  
7 30 ng / ml de rhEGF + soro de imunogene EGF @ 1/10  
8 30 ng / ml de rhEGF + soro de imunogene EGF @ 1/100  
9 30 ng / ml de rhEGF + soro de imunogene EGF @ 1/1000

**FIG. 9**



**FIG. 10**

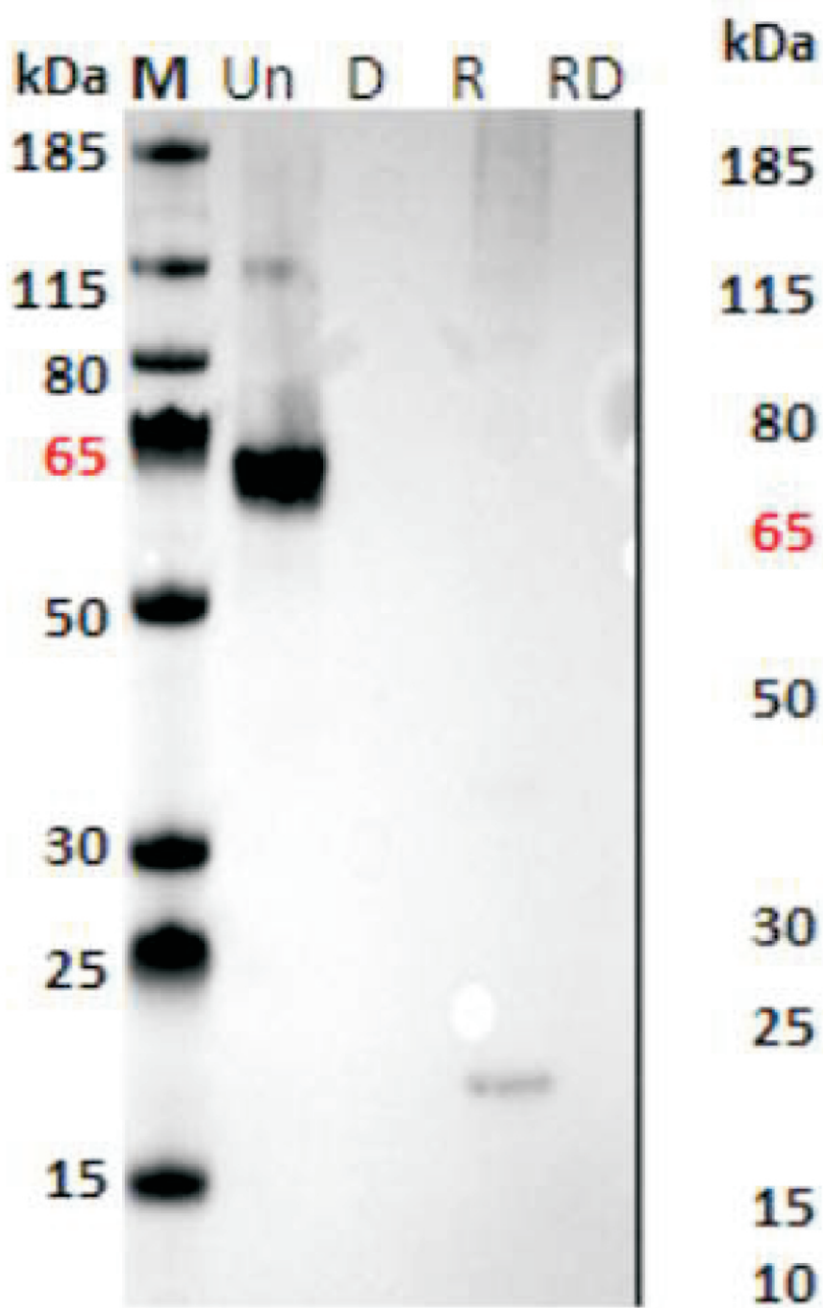
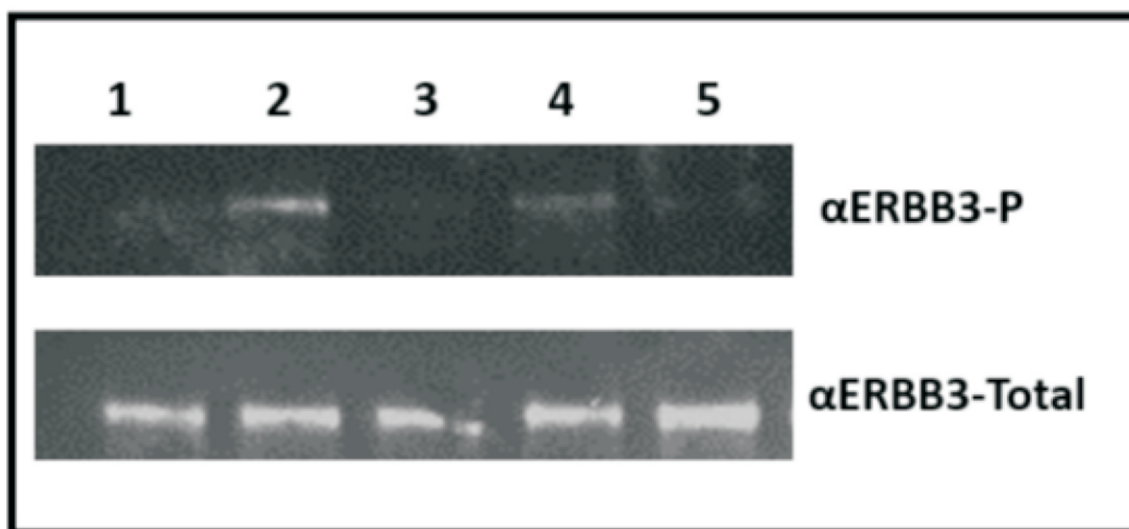
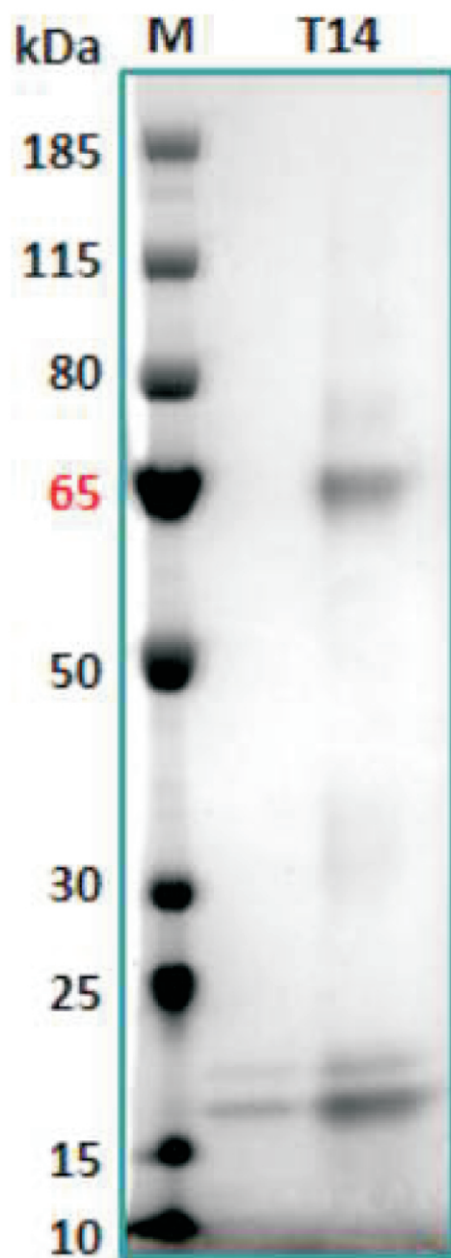


FIG. 11



Número	Tubo
1	Células somente / controle de referência
2	rhNRG $\beta$ 1 (50 ng/ml)
3	rhNRG $\beta$ 1 (50 ng/ml) + Ab AF396-NA
4	NRG sintético purificado (1:10,000)
5	NRG sintético purificado (1:10,000) + Ab AF396-NA

FIG. 12



**FIG. 13A**



**FIG. 13B**



**FIG. 13C**

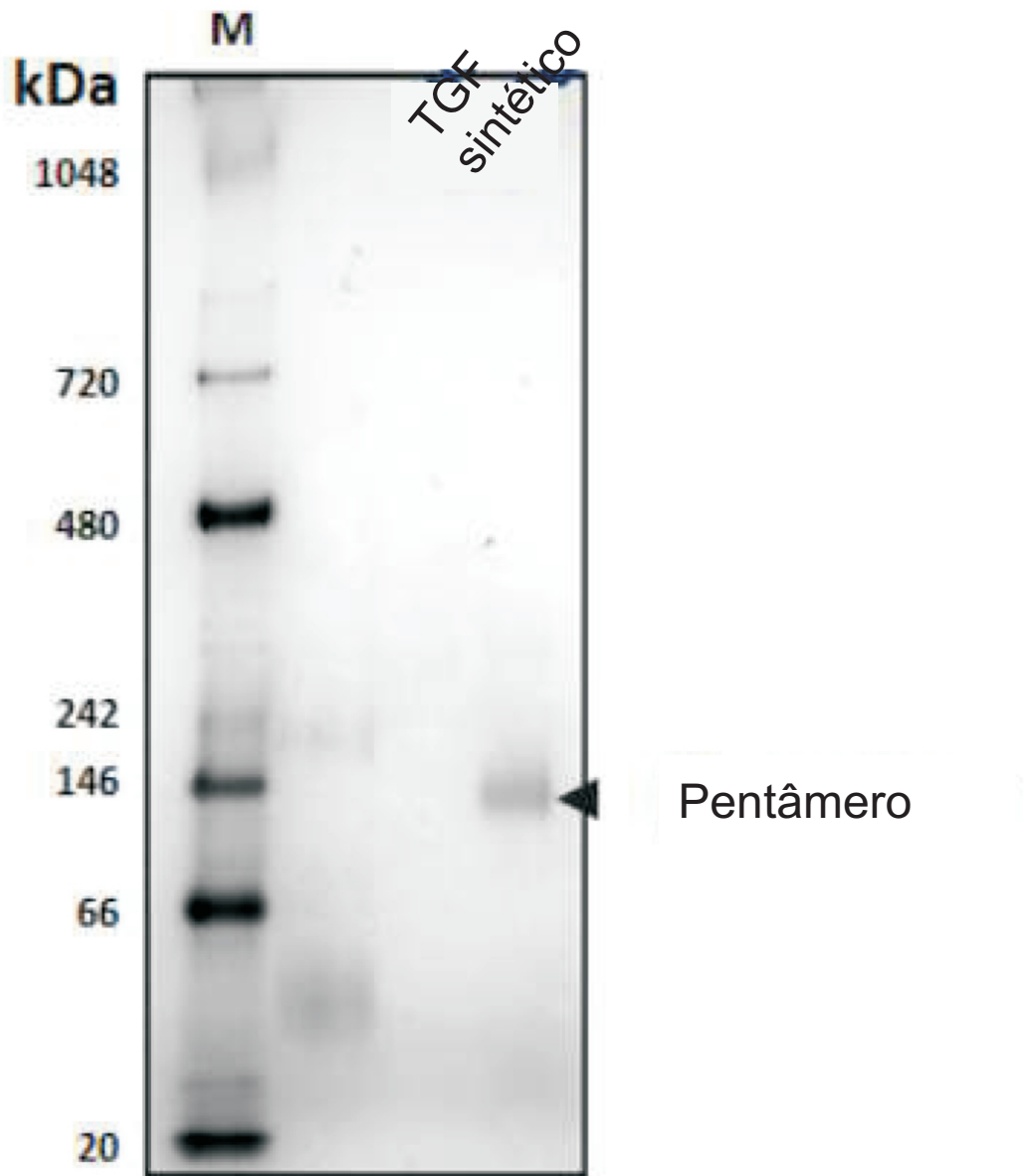


FIG. 14

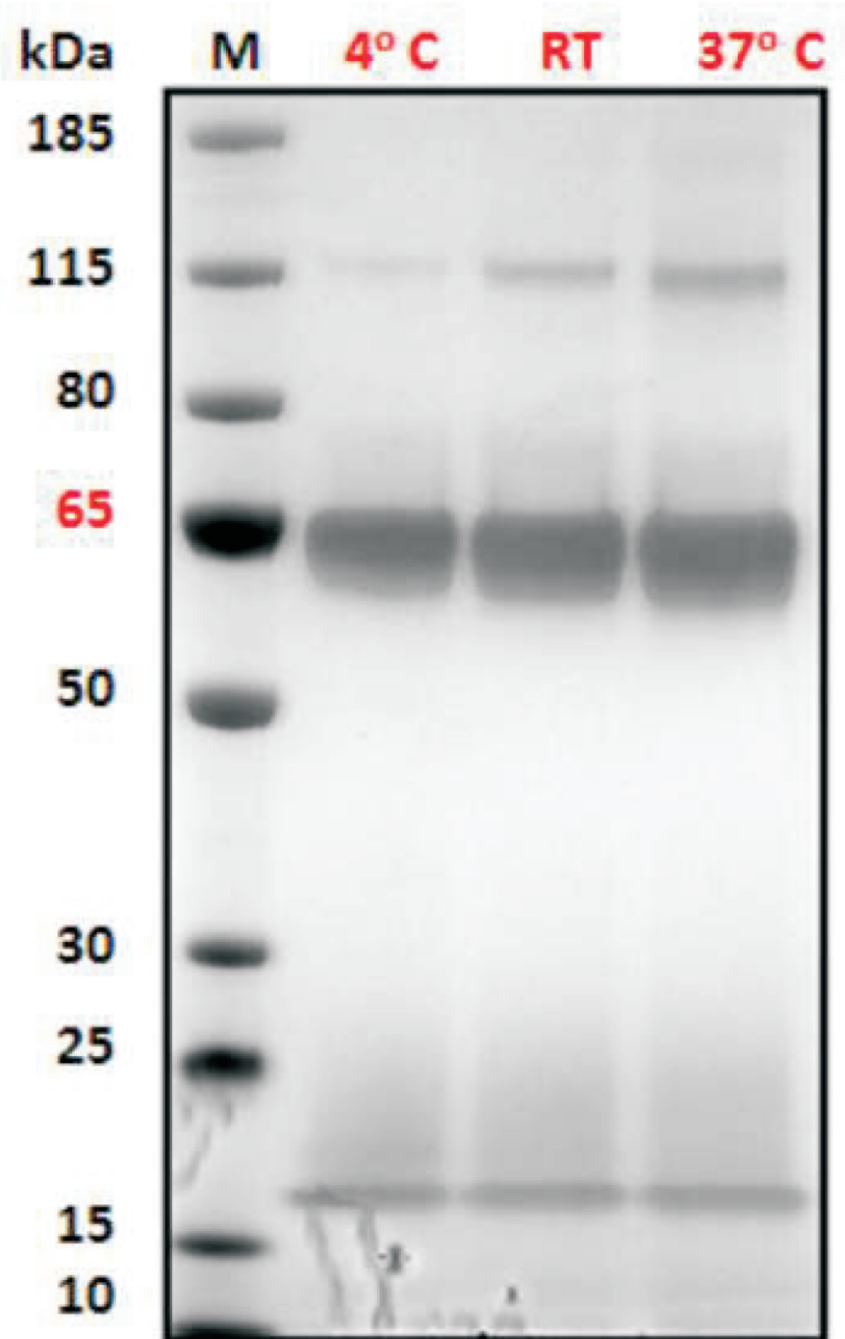


FIG. 15A

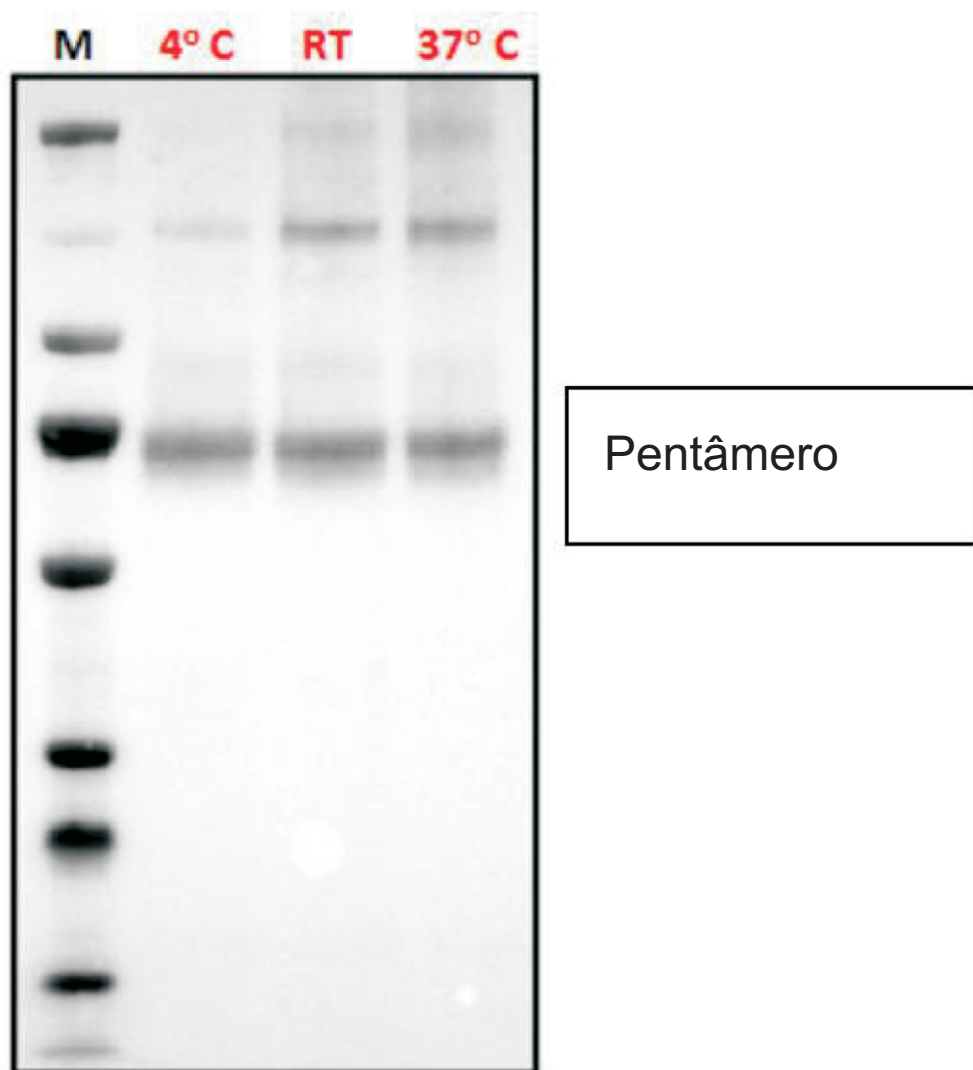


FIG. 15B

4843-6253-4509.1

## RESUMO

Patente de Invenção: **"PROTEÍNAS SINTÉTICAS E USOS TERA-PÊUTICOS DAS MESMAS"**.

A presente invenção refere-se a composições e métodos para o tratamento de doenças, particularmente, a invenção refere-se a proteínas sintéticas e seu uso para o tratamento de câncer.