



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0709787-5 A2**

(22) Data de Depósito: 08/05/2007
(43) Data da Publicação: 29/03/2011
(RPI 2099)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/535
C07K 14/54
C07K 16/18

(54) Título: **CITOCINAS COM ANTICORPOS
ALVEJADOS PARA TERAPIA**

(30) Prioridade Unionista: 08/05/2006 EP 06 009456.2

(73) Titular(es): Philogen S.P.A.

(72) Inventor(es): Dario Neri, Eveline Trachsel, Manuela Kaspar

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007004044 de 08/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/128563 de 15/11/2007

(57) Resumo: CITOCINAS COM ANTICORPOS ALVEJADOS PARA TERAPIA. presente invenção refere-se às proteínas de fusão que compreendem um anticorpo, seu fragmento funcional ou derivado funcional tendo afinidade de ligação específica ao domínio extracelular da fibronectina oncofetal (ED-B) ou a pelo menos um dos domínios extracelulares da tenascina oncofetal, fundido a uma citocina selecionada a partir do grupo que consiste em IL-10, IL-15, IL-24 e GM-CSF, fragmentos funcionais e derivados funcionais do mesmos. A invenção também é dirigida ao uso de pelo menos uma das ditas proteínas de fusão para a fabricação de um medicamento. Em particular, a invenção diz respeito ao uso do dito medicamento para o tratamento de tumores ou doenças inflamatórias crônicas, tais como a aterosclerose, a artrite e a psoríase.



PI0709787-5

**Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "CITOCINAS
COM ANTICORPOS ALVEJADOS PARA TERAPIA".**

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se às proteínas de fusão que com-
5 preendem um anticorpo, seu fragmento funcional ou derivado funcional ten-
do afinidade de ligação específica ao domínio extracelular da fibronectina
oncofetal (ED-B) ou a pelo menos um dos domínios extracelulares da tenas-
cina oncofetal, fundido a uma citocina selecionada a partir do grupo que
consiste em IL-10, IL15, IL-24 e GM-CSF, seus fragmentos funcionais e de-
10 rivados funcionais. A invenção também é dirigida ao uso de pelo menos uma
das ditas proteínas de fusão para a fabricação de um medicamento. Em par-
ticular, a invenção diz respeito ao uso do dito medicamento para o tratamen-
to de tumores ou doenças inflamatórias crônicas, tais como a aterosclerose,
a artrite e a psoríase.

15 Antecedentes Relevantes da Invenção

As citocinas são proteínas imunomoduladoras, algumas das
quais têm sido usadas de modo pré-clínico ou clínico não somente para
combater o câncer, como também para interferir com as condições inflama-
tórias crônicas e com a doença infecciosa.

20 O potencial terapêutico das citocinas recombinantes é freqüen-
temente limitado pelos efeitos colaterais graves, mesmo em baixas concen-
trações, assim impedindo concentrações de citocinas suficientes nos teci-
dos-alvo. Recentemente, os anticorpos monoclonais foram empregados para
alvejar e distribuir as citocinas para os locais da doença, para aumentar a
25 sua potência e poupar o tecido normal dos efeitos tóxicos. De fato, diversas
proteínas de fusão de anticorpo-citocina já foram investigadas para a aplica-
ção na terapia do câncer, freqüentemente com resultados impressionantes.
Por exemplo, o anticorpo humano L19 específico para o domínio ED-B da
fibronectina (um marcador de angiogênese) tem sido usado para distribuir as
30 citocinas pró-inflamatórias (tais como a IL-2, a IL-12 ou o TNF) para os tumo-
res sólidos, algumas vezes com benefícios terapêuticos extraordinários
[quanto a uma revisão e referências correspondentes, vide Neri e Bicknell,

Nat. Rev. Cancer (2005) 5:436-446, e também o WO 01/62298]. Entretanto, muitas citocinas têm uma história de fracasso clínico, tanto quando usadas como um agente individual, quanto como pares de fusão com os anticorpos monoclonais. Por exemplo, a IL-2 recombinante ("Proleucina", Quiron) foi

5 aprovada para o tratamento de pacientes com carcinoma de célula renal, porém as taxas de respostas são tipicamente baixas (geralmente abaixo de 20 %) para esta indicação e ainda menores para os outros tipos de câncer. Outras citocinas (tais como a interleucina-12 ou a interleucina-10, vide abaixo) fracassaram em demonstrar eficácia substancial em uma série de estudos clínicos, o que desacelerou os programas de desenvolvimento clínicos.

10 Estas citocinas não foram ainda aprovadas como substâncias biofarmacêuticas. O interferon gama é um outro exemplo de uma citocina aprovada para uma indicação muito estreita (tratamento de doença granulomatosa crônica, Genentech) que fracassou em demonstrar benefícios clínicos substanciais

15 para outras indicações.

Mesmo quando fundidas aos anticorpos, é imprevisível um ganho extraordinário no índice terapêutico. Por exemplo, a fusão de anticorpo anti-GD2-IL2 EMD273063 não conseguiu demonstrar benefícios terapêuticos substanciais em diversos ensaios clínicos, finalmente e igualmente importante em um ensaio em crianças com neuroblastoma (Osenga e outros, Clin. Cancer Res. Mar 15; 12(6):1750-9 (2006)).

20

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina homodimérica produzida por monócitos e células T ativados que está profundamente envolvida na regulação das respostas inflamatórias e das reações imunes. A sua função

25 global principal é mais bem descrita como supressora das respostas imunes, porém a IL-10 também possui atividades estimuladoras. A IL-10 foi primeiramente descrita como fator inibitório da síntese de citocinas (CSIF), uma atividade produzida pelas células Th2 de camundongo que inibia a ativação de e a produção de citocinas pelas células Th1 [Fiorentino e outros, J. Exp. Med. 170(6): 2081-95 (1989)]. O gene codificando a IL-10 humana está localizado sobre o cromossomo 1 [Kim e outros, J. Immunol. 148(11): 3618-23 (1992)] e é traduzido em uma proteína composta de 160 aminoácidos com

30

uma massa molecular de 18,5 kDa. A IL-10 humana é ativa como um homodímero não ligado ao dissulfeto de 37 kDa [Syto e outros, *Biochemistry* 37(48): 16943-51 (1998)].

5 A IL-10 tem sido considerada uma candidata atraente para uso terapêutico com base em suas atividades imunomoduladoras *in vitro* potentes e efeitos comprovados em modelos de animais de inflamação aguda e crônica, auto-imunidade, câncer e doença infecciosa. A Schering-Plough desenvolveu a IL-10 humana recombinante (ilodecacina, Tenovil®) para ensaios clínicos. A proteína é produzida em *E. coli* e consiste em 161 aminoácidos, idêntica com a proteína humana endógena, exceto por um resíduo de metionina na extremidade amino. Os ensaios clínicos de fases I e II, que investigam a segurança, a tolerância, a farmacocinética, a farmacodinâmica, os efeitos imunológicos e hematológicos de doses individuais ou múltiplas da IL-10 administrada por rotas intravenosas ou subcutâneas, têm sido efetuados em diversos ambientes de voluntários saudáveis e populações específicas de pacientes [Moore e outros, *Annu Rev. Immunol.* 19: 683-765 (2001)]. O desenvolvimento clínico, contudo, tem sido descontinuado devido à falta de eficácia do composto. Recentemente, apresentou-se um dado que pode explicar, pelo menos em parte, o dilema da terapia da IL-10. Tilg e outros verificaram que altas doses de IL-10 supra-regulam a produção de IFN-gama e neopterinina, com isso contrabalançando as suas propriedades imunossupressoras. Os autores concluíram que a ação terapêutica da hIL-10 administrada sistemicamente é limitada pelos efeitos pró-inflamatórios da citocina e sugerem que este problema pode ser contornado por abordagens que resultem na distribuição mucosa efetiva sem causar um aumento nas concentrações sistêmicas de IL-10 [Tilg e outros, *Gut* 50(2): 191-5 (2002)].

30 A interleucina-15 (IL-15) é um membro de 14 a 15 kDa da família do grupo da hélice 4 α de citocinas compostas de 114 aminoácidos. Em particular, a proteína IL-15 é regulada de modo pós-transcricional por múltiplos elementos controladores que inibem a tradução, incluindo 12 AUGs a montante da região não traduzida em 5' (UTR), 2 peptídeos de sinais incomuns (o peptídeo curto com 21 aminoácidos permanece de modo intracelular, o

peptídeo longo com 48 aminoácidos é para secreção) e a extremidade de C da proteína madura [Bamford e outros, J. Immunol., 160(9): 4418-26 (1998)]. Há 97% de identidade de sequência entre a IL-15 humana e de símio e 73% entre a humana e a de camundongo. Isto parece ser suficiente para a hIL-15 para torná-la biologicamente ativa sobre as células de símios e murinos. A IL-15 usa dois receptores distintos e vias de sinalização: Um sistema de IL-15R de alta afinidade que consiste nas subunidades de IL-2/15 β , γ_c e IL-15R α é expresso sobre as células T e NK. As subunidades de IL-2/15R β e as de γ_c são compartilhadas com o receptor de IL-2 [Giri e outros, EMBO J., 13(12):2822-30 (1994)]. Os mastócitos respondem à IL-15 com um sistema de receptor que não compartilha elementos com o receptor de IL-2, porém usa uma nova subunidade de IL-15RX de 60 a 65 kDa. Uma variedade de tecidos, tais como a placenta, os músculos esqueléticos, o rim, os fibroblastos, as células epiteliais, as células dendríticas e os monócitos, expressa a IL-15.

A IL-15 estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, o TNF α , a IL-1, o IFN γ), a proliferação e a síntese de Ig de células B ativadas, a ativação de T_H1, monócitos e células exterminadoras ativadas por linfocinas, a proliferação de mastócitos e células T e inibe a apoptose das células T e B. Além das atividades funcionais mencionadas, a IL-15 desempenha um papel importante no desenvolvimento, na sobrevivência e na função das células NK [Joost J. Oppenheim e outros, Cytokine Reference; 213-221, (2002)]. Os estudos *in vivo* demonstraram que a IL-15 exógena aumenta a atividade antitumor das células T CD8⁺ reativas ao tumor [Fehninger e outros, Cytokine Growth Factor Rev., 13(2):169-83 (2002)].

Os altos níveis anormais da expressão da IL-15 foram descritos nas doenças inflamatórias, neoplásticas e nas doenças auto-imunes, por exemplo, a artrite reumatóide, a colite ulcerativa, a doença de Crohn e a esclerose múltipla [Joost J. Oppenheim e outros, Cytokine Reference; 213-221, (2002)].

Porque a IL-2 e a IL-15 utilizam as mesmas subunidades de receptores, elas compartilham muitas características. As diferenças principais são os seus sítios de síntese e secreção. A IL-2 é produzida por células T

ativadas. Em contraste, a IL-15 é expressa em uma variedade de tecidos, conforme acima mencionado. Enquanto que a IL-2 pode promover a apoptose e a sobrevivência e a proliferação limitadas das células T de memória CD8⁺, a IL-15 auxilia a manter a população de CD8⁺ de memória e pode inibir a apoptose. A IL-15, inicialmente acreditada mediar efeitos biológicos básicos como a IL-2, foi mostrada ter propriedades únicas em estudos básicos e pré-clínicos que podem ser de benefício na imunoterapia do câncer [Fehninger e outros, *Cytokine Growth Factor Rev.*, (2):169-83 (2002)]. Também, o perfil de toxicidade da IL-15 assemelha-se àquele da IL-2 muito proximamente [Munger e outros, *Cell Immunol.*, 5(2):289-93 (1995)], assim sugerindo que a distribuição alvejada da IL-15 é superior à distribuição sistêmica em termos de índice terapêutico.

Os estudos para identificar os epítomos de IL-15 que são responsáveis pela ligação ao receptor da IL-15 revelaram mutantes da IL-15 que mostraram propriedades agonistas ou antagonistas que podem ser úteis como agentes terapêuticos [Bernard e outros, *J. Biol. Chem.*, 279(23):24313-22 (2004)]. Os mutantes da IL-15 IL-15D8S e IL-15Q108S eram inativos em um bioensaio de CTLL-2, porém eram capazes de inibir competitivamente a atividade biológica da IL-15 não modificada [Pettit e outros, *J. Biol. Chem.*, 272(4): 2312-8 (1997)].

O gene-7 associado à diferenciação do melanoma (mda-7 = IL-24) foi primeiramente identificado nos anos 90 como uma consequência de sua propriedade de ser induzido durante a diferenciação do melanoma. Ele é um membro da família de citocinas IL-10. O cDNA do gene IL-24 codifica uma proteína de 206 aminoácidos com 23,8 kDa. Nas células humanas, a proteína secretada tem um peso molecular significativamente mais elevado (40 kDa) devido à N-glicosilação forte comparada à proteína intracelular (30/23 kDa). A homologia da IL-24 humana ao correspondente do rato (MOB-5) é 68% e ao do camundongo (FISP) 69%. Existem dois receptores heterodiméricos funcionais para a IL-24: IL-20R1/IL-20R2 e IL-22R1/IL-20R2 [Wang e outros, *Genes Immun.*, 5(5):363-70 (2004)], [Chada e outros, *Mol. Ther.*, 10(6):1085-95 (2004)]. Embora as cadeias dos receptores IL-20R1 e

IL-22R1 sejam amplamente expressas, a expressão restrita do IL-20R2 comum em certos tecidos não hemopoéticos sugere uma função pleotrópica da IL-24 fora do sistema hemopoético [Wolk e outros, *J. Immunol.*, 168(11): 5397-402 (2002)]. A IL-24 é expressa por monócitos, células T, células dendríticas e melanócitos. A IL-24 induz a secreção de IFN γ , IL-6, TNF α , IL-1- β e GM-CSF, indicando a sua função como uma citocina pró-Th1. A IL-10 (citocina Th2) inibe a atividade da IL-24.

A quantidade de depósito de IL-24 está inversamente correlacionada com a progressão do melanoma. Estas verificações resultam na hipótese que a produção de mda-7 é perdida durante a invasão do melanoma, sugerindo uma função da IL-24 como um supressor do tumor [Chada e outros, *Mol. Ther.*, 10(6):1085-95 (2004)].

A expressão da IL-24 nos tumores pode promover a apresentação do antígeno por ativação ou estimulação das células imunes acessórias e efectoras [Chada e outros, *Mol. Ther.*, 10(6):1085-95 (2004)].

Um grande acervo de dados demonstra que a superexpressão do gene IL-24, usando os vetores de plasmídios ou um adenovírus defeituoso de replicação, resulta na supressão do crescimento e na indução da apoptose através da ativação das vias de sinalização intracelulares em uma ampla faixa de células de câncer. Este tipo de transferência de gene exibe toxicidade mínima sobre as células normais, ao mesmo tempo induzindo a apoptose potente em uma variedade de células de câncer [Sieger e outros, *Mol. Ther.*, 9(3):355-67 (2004)]. Um ensaio clínico de escalação de dose de fase I, onde as construções adenovirais que expressam a IL-24 foram administradas a 22 pacientes com câncer avançado, resultou na expressão da IL-24, na indução da apoptose em todos os tumores e os pacientes mostraram aumentos nas células T CD3⁺CD8⁺ após o tratamento. [Tong e outros, *Mol. Ther.*, 11(1):160-72 (2005)]. Diferentes estudos de transferência de genes da IL-24 observaram que os tumores eram menores e pareciam menos vascularizados comparados aos tumores de controle, o que indica atividade antian-giogênica da IL-24 [Saeki e outros, *Oncogene*, 21(29): 4558-66 (2002)]. Quando usando adenovírus mda-7 (Ad-mda7), é para ser observado que

existem desvantagens potenciais para a sua aplicação em uma indicação clínica: em primeiro lugar, não é prática a transdução *ex vivo* das células de câncer humanas obtidas de pacientes com câncer com Ad-Mda7, seguida por introdução novamente nos pacientes com câncer; em segundo lugar, a administração intratumoral de Ad-mda7 para gerar uma resposta imune anti-tumor potente é aplicável somente aos tumores localizados e não para os tumores disseminados. Assim, abordagens alternativas necessitam ser desenvolvidas [Miyahara e outros, Cancer Gene Ther. 2006].

O fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) é uma proteína de 141 aminoácidos (camundongo)/144 aminoácidos (ser humano) contendo uma sequência de secreção de 17 aminoácidos. O peso molecular aparente da proteína glicosilada madura é 14 - 33 kDa, que é muito resistente às condições de desnaturação e proteolíticas. As atividades *in vivo* do GM-CSF são mediadas por ligação a receptores de altas afinidades que compreendem uma cadeia α específica para o GM-CSF e, para os seres humanos, uma subunidade β de transdução de sinal que é compartilhada com a IL-3 e os receptores de IL-5 [Joost J. Oppenheim e outros, Cytokine Reference, 899-908, 2002].

O GM-CSF é um regulador principal da linhagem de granulócitos e macrófagos. Ele estimula a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação das células formadoras de colônias hematopoéticas das linhagens de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Em adição, ele mantém a sobrevivência das células formadoras de colônicas hematopoéticas das linhagens de células megacariocíticas e eritróides [Joost J. Oppenheim e outros, Cytokine Reference, 899-908, 2002]. Ele também é um imunoestimulador potente com efeitos pleiotrópicos, incluindo o aumento da apresentação de Ag em uma variedade de células, a expressão aumentada do MHC classe II sobre monócitos e a amplificação da proliferação das células T [Fischer e outros, J. Immunol., 141(11):3882-8 (1988), Smith e outros, J. Immunol., 144(10):3829-34 (1990), Morrissey e outros, J. Immunol., 139(4):1113-9 (1987)].

Na patologia, a superexpressão do GM-CSF pode resultar em reações inflamatórias (por exemplo, artrite reumatóide), choque tóxico, ce-

gueira e auto-imunidade, ao mesmo tempo em que os níveis subfisiológicos podem estar envolvidos em alguns casos de proteinose alveolar. A proteinose alveolar é uma doença do pulmão fatal onde as proteínas tensoativas acumulam-se no pulmão devido a um defeito na depuração mediada por macrófagos [Joost J. Oppenheim e outros, Cytokine Reference; 899-908, 2002].

Em modelos de animais, a vacinação de camundongos contendo o melanoma B16 com células de tumor irradiadas adicionais que expressam o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) estimulou uma imunidade antitumor potente, de longa duração e específica, por aumento da imunogenicidade dos tumores [Dranoff e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90(8):3539-43 (1993)]. Adicionalmente, o GM-CSF é amplamente usado em oncologia para reduzir a neutropenia relacionada à quimioterapia, uma redução de neutrófilos causada por fármacos quimioterapêuticos [Danova e outros, Haematologica, 82(5):622-9 (1997)], [Vose e outros, J. Clin. Oncol., 13(4):1023-35 (1995)]. Há um limiar acima do qual uma vacina à base de GM-CSF não somente perde a sua eficácia, como, de modo mais importante, resulta em imunossupressão substancial *in vivo*. Os efeitos duplos do GM-CSF são mediados pela concentração sistêmica, e não pela local, desta citocina [Serafini e outros, Cancer Res., 64(17):6337-43 (2004)]. Diversos eventos adversos são vistos em doses de 16 µg/kg por dia para os seres humanos [Joost J. Oppenheim e outros, Cytokine Reference; 899-908 (2002)].

As fibronectinas são glicoproteínas adesivas de altos pesos moleculares, presentes, na forma solúvel, no plasma e em outros fluidos corpóreos e, na forma insolúvel, na matriz extracelular. O EDB é um domínio de homologia do tipo III de 91 aminoácidos, que é inserido na molécula de fibronectina por um mecanismo de remoção alternativa no nível do transcrito primário sempre que ocorrer a remodelagem do tecido [Zardi e outros, Embo J. 6(8): 2337-42 (1987)].

O EDB é essencialmente indetectável nos tecidos adultos saudáveis. A sua expressão está fortemente associada com a remodelagem da matriz extracelular e a angiogênese. O domínio é abundante em muitos tu-

mores agressivos e, dependendo do tipo de tumor, mostra padrões estro-
 mais de expressão predominantemente vasculares ou difusos [Carnemolla e
 outros, J. Cell Biol. 108(3): 1139-48 (1989)]. Apesar de sua expressão muito
 restrita nos tecidos normais e de sua forte expressão em muitos tumores
 5 sólidos, a função do EDB não parece ser indispensável, porque os camun-
 dongos que não têm o exon de EDB desenvolvem-se normalmente, são fér-
 teis e curam os fragmentos ósseos. Além disso, os camundongos "nocautes"
 duplos que não têm o exon de EDB e p53 não mostraram qualquer diferença
 na duração da sobrevivência em comparação com os animais que expres-
 10 sam o EDB [Fukuda e outros, Cancer Res 62(19): 5603-10 (2002)].

Porque a seqüência de EDB é idêntica no camundongo, no rato,
 no coelho, no cão, no macaco e no homem, não tinha sido ainda possível
 produzir anticorpos contra este domínio por tecnologia de hibridoma, devido
 à tolerância natural. Alguns anos atrás, os fragmentos de anticorpos scFv de
 15 altas afinidades (L19) contra o EDB foram isolados por tecnologia de exposi-
 ção em fago [Carnemolla e outros, Int. J. Cancer 68(3): 397-405 (1996); Neri
 e col, Nat. Biotechnol. 15(12): 1271-5. (1997); Pini e outros, J. Biol. Chem.
 273(34): 21769-76 (1998)]. O L19 é capaz de tingir os vasos sanguíneos do
 tumor em uma ampla faixa de modelos experimentais de tumor e sobre sec-
 20 ções de tumores humanos e outros distúrbios angiogênicos [Carnemolla e
 outros, J. Cell Biol. 108(3): 1139-48 (1989); Kaczmarek e outros, Int. J. Can-
 cer 59(1): 11-6 (1994); Berndt e outros, HistoChem. Cell Biol. 109(3): 249-55
 (1998)]. Castellani e outros mostraram que o L19 tingiu os vasos sanguíneos
 do tumor nos astrocitomas graus III-IV, porém menos do que 10% dos vasos
 25 nos astrocitomas graus I-II, sugerindo que a expressão do EDB nestas le-
 sões poderia ser usada para a graduação dos tumores [Castellani e outros,
 Am. J. Pathol. 161(5): 1695-700 (2002)].

Devido à conservação do antígeno, o desempenho de alveja-
 mento do L19 poderia ser investigado em modelos de animais singênicos
 30 imunocompetentes. Os estudos de biodistribuição com diferentes formatos
 de anticorpos radiomarcados (scFv, proteína imuno pequena/SIP e IgG)
 mostraram um acúmulo preferencial de até 20 % de dose injetada por grama

de tecido (% de DI/g) de L19 no local do tumor [Borsi e outros, Blood 102(13): 4384-92 (2003)]. Os primeiros estudos de imunocintigrafia em pacientes humanos tendo câncer com o fragmento de anticorpo biespecífico ("diacorpo") L19 marcado com ^{123}I confirmaram que o anticorpo também localiza para tumores sólidos humanos e metástases [Santimaria e outros, Clin. Cancer Res. 9(2): 571-9 (2003)].

O domínio EDB de fibronectina é um marcador de boa qualidade da angiogênese, o qual é superexpresso em uma variedade de tumores sólidos (por exemplo, carcinoma de célula renal, carcinoma colorretal, carcinoma hepatocelular, astrocitomas de altos graus, tumores da cabeça e do pescoço, câncer da bexiga, etc.), porém é virtualmente indetectável nos tecidos adultos normais (exceção feita para o endométrio na fase proliferativa e alguns vasos nos ovários). Entretanto, o EDB é somente fracamente expresso na maioria das formas de câncer de mama, câncer de próstata e alguns tipos de câncer de pulmão, assim estimulando a pesquisa por novos antígenos de tumores vasculares, os quais poderiam ser usados para a distribuição alvejada, mediada por anticorpos, de citocinas terapêuticas para estas neoplasias.

Além do EDB, os domínios extracelulares da tenascina oncofetal têm sido estabelecidos como um alvo interessante na terapia. As isoformas de remoção da tenascina-C são consideradas alvos para as estratégias terapêuticas à base de anticorpos, particularmente para aquelas classes de tumores nas quais podem ser detectados baixos níveis de EDB. A tenascina-C é uma glicoproteína da matriz extracelular. Ela compreende diversas repetições de homologia do tipo 3 de fibronectina que podem ser incluídas ou omitidas no transcrito primário por remoção alternativa, resultando em isoformas pequenas e grandes que têm funções biológicas distintas. Embora a isoforma pequena seja expressa em diversos tecidos, a isoforma grande de tenascina-C exibe um padrão de expressão mais restrito. Ela é virtualmente indetectável em tecidos adultos saudáveis, porém é expressa durante a embriogênese e é novamente expressa em tecidos adultos sofrendo remodelagem, incluindo a neoplasia. A sua expressão está localizada em torno de

estruturas vasculares no estroma do tumor de uma variedade de tumores diferentes, incluindo o carcinoma da mama, o carcinoma de célula escamosa oral, o câncer do pulmão, o adenocarcinoma prostático, o câncer colorretal ou o astrocitoma e outros tumores do cérebro. Tradicionalmente, a comunidade científica referia-se à isoforma grande de tenascina-C para as moléculas de tenascina, as quais compreenderiam putativamente todos os domínios alternativamente removidos, e à isoforma pequena da tenascina-C sempre que estes domínios estavam ausentes. Carnemolla e colegas relataram que o domínio C alternativamente removido da tenascina-C exibia um padrão mais restrito de expressão, quando comparado aos outros domínios alternativamente removidos. Permaneceu confuso naquela ocasião se os outros domínios alternativamente removidos da tenascina-C também exibiam incorporação restrita na molécula de tenascina e se seria mais apropriado avaliar os domínios removidos individuais separadamente como alvos para estratégias terapêuticas à base de anticorpos. Os anticorpos radiomarcados específicos para os domínios A1 e D da tenascina-C foram empregados com êxito na clínica para o tratamento de glioma e linfoma. Além disso, o alveijamento do tumor eficiente pelos anticorpos antitenascina tem sido demonstrado clinicamente usando uma abordagem pré-alveijamento à base de avidina/biotina ou, mais recentemente, com anticorpos monoclonais específicos para a isoforma pequena da tenascina-C. Entretanto, todos estes anticorpos são de origem de murino e, portanto, são mais provavelmente não adequados para a administração repetitiva aos pacientes humanos e o desenvolvimento de substâncias biofarmacêuticas. Por estas razões, os anticorpos humanos específicos para os domínios A1, C e D da tenascina-C foram gerados usando a tecnologia de fago de anticorpo [PCT/EP2005/011624 de Philogen S.p.A].

Conforme demonstrado acima, há ainda uma alta incerteza envolvida no campo em relação à utilidade terapêutica das citocinas em geral, em particular à utilidade terapêutica das citocinas para o tratamento de tumores e/ou doenças inflamatórias. Embora a técnica anterior esporadicamente indique que algumas proteínas de fusão específicas de anticorpos-

citocinas poderiam permitir o tratamento terapêutico direcionado para o alvo, não há ainda nenhuma expectativa razoável de sucesso porque os resultados não são previsíveis. A pessoa versada é deixada imaginando com relação à natureza de uma citocina terapeuticamente útil e ao efeito que a sua
 5 combinação com um anticorpo ou seu derivado teria. Portanto, a pessoa versada requer habilidade inventiva para selecionar a combinação certa das muitas citocinas conhecidas e dos muitos anticorpos de alveijamento conhecidos porque o resultado não pode ser previsto.

É o objetivo da presente invenção proporcionar novas substâncias terapêuticas para o tratamento de câncer e/ou doenças inflamatórias,
 10 em particular para o tratamento de psoríase, aterosclerose e artrite, que permitam a distribuição alvejada da substância terapêutica para os locais da doença, o que, por sua vez, permite a concentração do medicamento e a redução da carga tóxica para os tecidos saudáveis restantes.

15 Descrição da invenção

Foi surpreendentemente verificado que a combinação específica de um anticorpo que alveja o domínio extracelular da fibronectina oncofetal (ED-B) ou os domínios extracelulares da tenascina oncofetal, fundido a uma citocina selecionada a partir do grupo que consiste em (a) IL-10, (b) IL15, (c)
 20 IL-24 e (d) GM-CSF, proporciona uma nova proteína de fusão terapeuticamente efetiva.

Portanto, o objetivo acima mencionado é resolvido proporcionando uma proteína de fusão compreendendo:

- (i) um anticorpo, seu fragmento funcional ou derivado funcional tendo uma
 25 afinidade de ligação específica ao domínio extracelular da fibronectina oncofetal (ED-B) ou a pelo menos um dos domínios extracelulares da tenascina oncofetal, fundido a
- (ii) uma citocina selecionada a partir do grupo que consiste em (a) IL-10, (b) IL15, (c) IL-24 e (d) GM-CSF, seus fragmentos funcionais e derivados fun-
 30 cionais.

O termo "afinidade de ligação específica", como é usado neste documento, é para ser entendido significar que o anticorpo, o fragmento fun-

cional ou o derivado funcional dele especificamente se liga à proteína-alvo com afinidade significativa e não a outras proteínas com afinidade significativa que estão também localizadas no mesmo ambiente, isto é, o sistema de ensaio ou o corpo, o órgão, etc., *in vivo* ou *in vitro*, e sob as mesmas condições, por exemplo, pH, temperatura, tampão, etc. Em geral, uma especificidade de ligação é testada efetuando-se um ensaio de ligação com uma molécula-alvo específica e com um grande número de substâncias não relacionadas. Além disso, os testes funcionais, a imunoistoquímica e os outros procedimentos podem ser usados para avaliar a especificidade de ligação de um anticorpo especificado.

Para muitos bioensaios (por exemplo, ELISA) baseados em anticorpos, fragmentos funcionais ou derivados funcionais deles capazes de ligação específica, uma constante de dissociação de 1 micromolar ou menos é requerida para produzir sinais de ligação detectáveis, os quais são frequentemente associados com um modo de ligação específico. De preferência, os anticorpos, os fragmentos funcionais ou os derivados funcionais para uso na presente invenção têm uma afinidade de ligação específica correspondendo a uma constante de dissociação de menos do que cerca de 5, preferivelmente cerca de 1 ou menos micromolar (μM), mais preferivelmente cerca de 0,1 μM ou menos, mais preferivelmente ainda cerca de 1 nM ou menos ou mesmo 1 pM ou menos.

Os anticorpos, os fragmentos funcionais e os derivados funcionais deles, para praticar a invenção, estão rotineiramente disponíveis por tecnologia de hibridoma (Kohler e Milstein, *Nature* 256, 495-497, 1975), exposição de anticorpo em fago (Winter e outros, *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455, 1994), exposição em ribossomo (Schaffitzel e outros, *J. Immunol. Methods*, 231, 119-135, 1999) e triagem em filtro de colônia iterativa (Giovannoni e outros, *Nucleic Acids Res.* 29, E27, 2001) assim que o antígeno-alvo estiver disponível. As proteases típicas para fragmentar os anticorpos em produtos funcionais são bastante conhecidas. Outras técnicas de fragmentação podem ser usadas também, desde que o fragmento resultante tenha uma alta afinidade específica e, preferivelmente uma constante de

dissociação na faixa de micromolares a picomolares.

O desempenho de alvejamento do tumor vascular dos fragmentos de anticorpos no formato scFv tem sido mostrado para depender crucialmente (pelo menos para a constante de dissociação de micromolares a picomolares) da afinidade do anticorpo pelo alvo. Por exemplo, o fragmento de anticorpo scFv(L19) de alta afinidade, específico para o domínio ED-B da fibronectina, um marcador da angiogênese, foi mostrado alvejar a neovascularização do tumor mais eficientemente do que o fragmento de anticorpo parental scFv(E1), com uma afinidade menor pelo antígeno [Viti e outros, Cancer Res. 15;59(2):347-52 (1999)]. Em certos casos, a avidéz da ligação (por exemplo, associada com certos formatos de anticorpos homobivalentes) pode compensar uma afinidade de ligação monomérica moderada [Nielsen e outros, Cancer Res., 60(22):6434-40 (2000)].

Um fragmento de anticorpo muito conveniente para aplicações de alvejamento é o fragmento Fv de cadeia individual, no qual um domínio pesado variável e um leve variável são unidos conjuntamente por um ligador de polipeptídeo. Os outros fragmentos de anticorpos para aplicações de alvejamento vascular incluem os fragmentos Fab, os fragmentos Fab₂, os minianticorpos (também chamados proteínas imunes pequenas), as fusões de scFv-scFv em série, bem como as fusões de scFv com domínios adequados (por exemplo, com a porção Fc de uma imunoglobulina). Quanto a uma revisão sobre certos formatos de anticorpos, vide Holliger P, Hudson PJ.; Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol. set. de 2005, 23(9):1126-36.).

O termo "derivado funcional" de um anticorpo para uso na presente invenção é pretendido incluir qualquer anticorpo ou fragmento dele que tenha sido química ou geneticamente modificado em sua sequência de aminoácidos, por exemplo, por adição, substituição e/ou remoção de resíduo(s) de aminoácido(s) e/ou tenha sido quimicamente modificado em pelo menos um de seus átomos e/ou grupos químicos funcionais, por exemplo, por adições, remoções, rearranjo, oxidação, redução, etc., desde que o derivado tenha substancialmente a mesma afinidade de ligação que ao seu an-

tígeno original e, preferivelmente, tenha uma constante de dissociação na faixa de micro-, nano- ou picomolares. Um derivado mais preferido dos anticorpos para uso na presente invenção é uma proteína de fusão de anticorpo que será definida em mais detalhe abaixo.

5 Em uma modalidade preferida, o anticorpo, o fragmento ou o derivado funcional dele, para uso na invenção, é um que é selecionado a partir do grupo consistindo em anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos com CDR enxertada, fragmentos Fv, fragmentos Fab e fragmentos Fab₂ e proteínas de
10 ligação similares aos anticorpos, por exemplo, afilinas, anticalinas e aptâmeros.

 Quanto a uma revisão das proteínas de ligação similares aos anticorpos, vide Binz e outros sobre proteínas de ligação de engenharia a partir de domínios que não de imunoglobulina em *Nature Biotechnology*. vol.
15 23, Nº 10, outubro de 2005, 12571268. O termo "aptâmero" descreve ácidos nucleicos que se ligam a um polipeptídeo com alta afinidade. Os aptâmeros podem ser isolados a partir de uma grande união de diferentes moléculas de RNA de fitas simples por métodos de seleção, tais como SELEX (vide, por exemplo, Jayasena, *Clin. Chem.*, 45, págs. 1628 - 1650, (1999); Klug e Fa-
20 mulok, *M. Mol. Biol. Rep.*, 20, págs. 97 - 107 (1994); US 5.582.981). Os aptâmeros podem também ser sintetizados e selecionados na sua forma espe-
 cular, por exemplo, como o L-ribonucleotídeo (Nolte e outros, *Nat. Biotechnol.*, 14, págs. 1116 — 1119, (1996); Klussmann e outros, *Nat. Biotechnol.*,
14, págs. 1112 - 1115, (1996)). As formas isoladas neste modo têm a vanta-
25 gem que elas não são degradadas por ribonucleases de ocorrência natural e, portanto, têm uma estabilidade maior.

 Uma outra proteína de ligação similar ao anticorpo e alternativa aos anticorpos clássicos são os assim chamados "andaimes protéicos", por exemplo, anticalinas, que são baseados na lipocalina (Beste e outros, *Proc.*
30 *Natl. Acad. Sci. USA*, 96, págs. 1898 - 1903, (1999)). Os sítios de ligação ao ligante naturais das lipocalinas, por exemplo, da proteína de ligação ao retinol ou proteína de ligação à bilina, podem ser alterados, por exemplo, em-

pregando uma abordagem de "projeto de proteína combinatório", e em um modo tal que eles ligam haptenos selecionados (Skerra, BioChem. Biophys. Acta, 1482, págs. 337 - 350, (2000)). Quanto aos outros arcabouços protéicos, sabe-se também que eles são alternativos para os anticorpos (Skerra, J. Mol. Recognit, 13, págs. 167 - 287, (2000)). (Hey, Trends in Biotechnology, 23, págs. 514-522, (2005)).

De acordo com a invenção, o termo derivado de anticorpo funcional é pretendido incluir as ditas alternativas derivadas de proteínas para os anticorpos, isto é, as proteínas de ligação similares aos anticorpos, por exemplo, afillinas, anticalinas e aptâmeros que reconhecem especificamente pelo menos um domínio extracelular de fibronectina oncofetal ou tenascina oncofetal.

Em resumo, os termos anticorpo, fragmento funcional e derivado funcional dele significam todas as substâncias que têm afinidade de ligação específica igual ou similar a qualquer um dos domínios extracelulares da fibronectina oncofetal ou da tenascina oncofetal como um anticorpo completo tendo afinidade de ligação específica a estes alvos.

Para a tenascina, há diversas isoformas disponíveis, por exemplo, a tenascina-C, a tenascina-R e a tenascina-X. Para praticar a presente invenção, os domínios extracelulares da grande isoforma da tenascina-C são mais preferidos como alvos específicos para o anticorpo, o seu fragmento funcional ou derivado funcional que é parte das proteínas de fusão da presente invenção.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo, o seu fragmento funcional ou derivado funcional, que é parte de uma proteína de fusão da invenção, tem uma afinidade de ligação específica a pelo menos um dos domínios extracelulares da tenascina-C oncofetal, mais preferivelmente a pelo menos um dos domínios extracelulares da isoforma grande da tenascina-C.

Os domínios extracelulares da tenascina-C são designados domínios A1, A2, A3, A4, B, C e D. Já existem diversos anticorpos disponíveis que são direcionados contra um destes domínios (vide Siri A. e outros, Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degrada-

tion by matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem., 14 de abril de 1995, 270(15):8650-4; Carnemolla B. e outros, Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody. Am. J. Pathol. maio de 1999, 154(5): 1345-52; Silacci M. e col, Human monoclonal
 5 antibodies to domain C of tenascin-C selectively target solid tumors in vivo. Protein Eng. Des. Sel. out. de 2006, 19(10):471-8).

Em uma modalidade mais preferida, a presente invenção refere-se às proteínas de fusão da invenção compreendendo um anticorpo, seu fragmento funcional ou derivado funcional tendo afinidade de ligação específica a qualquer um dos domínios extracelulares da tenascina-C, isto é, A1,
 10 A2, A3, A4, B, C e D, preferivelmente a qualquer um dos domínios A1, C ou D, mais preferivelmente ao domínio C da tenascina-C.

O termo "proteína de fusão", conforme é usado no contexto da presente invenção, é pretendido incluir todos os conjugados, onde o dito anticorpo, fragmento ou derivado funcional está de certo modo ligado a uma
 15 citocina selecionada a partir do grupo que consiste em (a) IL-10, (b) IL15, (c) IL-24 e (d) GM-CSF, seus fragmentos funcionais e derivados funcionais, através de, por exemplo, ligações covalentes e/ou não-covalentes, por exemplo, iônicas. O termo inclui ambos os arranjos de ligação, isto é, anticorpo -
 20 citocina ou citocina - anticorpo.

Os termos fragmento funcional e derivado funcional com relação às ditas citocinas são para serem interpretados essencialmente em analogia aos mesmos termos para os anticorpos. Os fragmentos e os derivados funcionais das citocinas são aqueles que essencialmente têm a mesma função/atividade fisiológica que as citocinas de ocorrência natural. Por exemplo,
 25 os ensaios preferidos para determinar a função/atividade das citocinas, dos fragmentos e dos derivados delas, para preparar as proteínas de fusão de acordo com a presente invenção, são:

A atividade/função da citocina de IL-10 ou de seus derivados
 30 funcionais pode ser determinada efetuando-se um ensaio de proliferação sobre os mastócitos MC/9 de murinos. Por exemplo, as ditas células são cultivadas em meio DMEM contendo 10% de FBS, 10% de T-Stim de Rato

(Becton Dickinson), 1% de antibiótico, glutamina a 2 mM e β -mercaptoetanol a 0,05 mM [Thompson-Snipes e outros, J. Exp. Med. 173(2): 507-10 (1991)]. Para preparar o ensaio, 100 μ l de meio sem T-Stim de Rato são colocados em cada cavidade de uma placa de cultura de tecido de fundo plano de 96 cavidades, com ligação ultra baixa (Costar[®] 3474), exceto pela primeira fileira. 200 μ l de IL-10 humana recombinante (rhu) (100 ng/ml), ou uma quantidade molar equivalente da amostra a ser testada, são colocadas nas cavidades na primeira fileira. As diluições em série a 1:2 através das fileiras da placa de microtítulo são preparadas por transferência de 100 μ l da amostra para a cavidade seguinte na fileira e mistura começando a partir da primeira fileira. Uma fileira das cavidades contém somente 100 μ l de meio de ensaio (sem citocina) como um controle negativo. As células MC/9 são então contadas e diluídas até uma concentração de 5×10^5 células/ml. Para remover a citocina residual, as células são lavadas duas vezes com meio de cultura sem T-Stim de Rato por centrifugação das células, aspiração do meio e resuspensão delas novamente em meio novo. 100 μ l desta suspensão celular são adicionadas nas cavidades da placa de 96 cavidades (5×10^4 células/cavidade). Após 48 - 72 horas, 20 μ l de solução de MTT a 5 mg/ml (em PBS, filtrada), um substrato para a desidrogenase mitocondrial, são adicionados às células. 4 horas mais tarde, a placa é centrifugada a 2400 g por 10 minutos. O meio é aspirado e as células são lisadas por adição de 100 μ l de DMSO (Fluka 41641). Finalmente, as placas são lidas a 570 nm. Cada concentração é efetuada em triplicata.

Por exemplo, a atividade/função da citocina de hIL-15 ou de seus derivados funcionais pode ser determinada (manual de Biosource Cytokine Facts) efetuando-se um ensaio sobre a linhagem de linfócitos T citotóxicos 2 (CTLL-2). As ditas células são desenvolvidas em meio RPMI contendo 10% de FBS, 1% de antibióticos, glutamina a 2 mM (100x), piruvato de sódio a 1 mM (100x) e 2-mercaptoetanol a 50 μ M (1000x). Adicionalmente, as células CTLL-2 requerem 20 U/ml de hIL-2 (Roche 1 011 456). Aproximadamente uma semana antes do início do ensaio, as células devem ser subalimentadas e recebem somente 10 U/ml de hIL-2. Para a preparação do

ensaio, 50 µl do meio de ensaio de CTLL-2 são adicionados a cada cavidade de uma placa de cultura de tecido de fundo plano de 96 cavidades com ligação ultra baixa (Costar® 3474), exceto pela primeira fileira. 100 µl de padrão de IL-15 humana recombinante (10 ng/ml), ou uma quantidade equimolar da amostra de teste, são colocados no primeira cavidade. As diluições em série a 1:2 são feitas por transferência de 50 µl para a cavidade seguinte na fileira começando na primeira fileira. Uma fileira das cavidades contém somente 50 µl de meio de ensaio (sem rhIL-15) como um controle negativo. As células CTLL-2 são contadas e diluídas até uma concentração de 5×10^5 células/ml.

Para remover a hIL-2 residual, as células são lavadas como se segue: após centrifugar as células 5 minutos a 1100 rpm, o meio é aspirado e os precipitados de células são novamente suspensos no meio novo. Este procedimento de lavagem é repetido duas vezes. 50 µl da suspensão celular são adicionados a cada cavidade da placa de microtítulos (5×10^4 células/cavidade) e a placa é incubada a 37°C e 5% de CO₂. As medições são feitas em triplicata. Após 72 horas, 20 µl de solução de MTT a 5 mg/ml (Sigma 206-069-5) (em PBS) são adicionados a cada cavidade. 2 a 4 horas mais tarde, a placa é centrifugada a 2400 g por 10 minutos. O meio é aspirado e as células são lisadas por adição de 100 µl de DMSO (Fluka 41641). Então, a placa é lida a 570 nm.

Por exemplo, para testar a função/atividade biológica da IL-24 ou de um derivado funcional dela como uma citocina, a sua indução da secreção de citocinas secundárias (IL-26, TNF α e IFN γ) pela PBMC pode ser examinada [Caudell e outros, J. Immunol., 168(12):6041-6 (2002)]. A detecção das citocinas secundárias pode ser feita por ELISA(s) específico(s).

Uma outra opção é testar a capacidade da IL-24, ou de um derivado funcional dela, de induzir seletivamente a apoptose em células de câncer [Sauane e outros, Cancer Biol. Ther., 3(8):739-51 (2004)]. Para efetuar isto, podem ser usadas células de câncer como DU-145, PC-3, LNCaP, MDA-MB-231 e outras. As células são preparadas em placas de 96 cavidades e deixadas unir por 12 h, antes do tratamento com IL-24 (concentrações diferentes, normalmente cerca de 25-50 µg/ml). As células são incubadas

por 5-7 dias. O desenvolvimento das células e os números de células viáveis são monitorados por coloração com MTT. A absorbância resultante medida a 570 nm é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Por exemplo, a atividade/função da citocina de GM-CSF, ou de um derivado funcional dele, pode ser determinada (manual de Biosource Cytokine Facts) efetuando-se um ensaio de proliferação sobre os mastócitos de murinos MC/9. As ditas células são cultivadas em meio DMEM contendo 10% de FBS, 10% de T-Stim de Rato (Becton Dickinson), 1% de antibiótico, glutamina a 2 mM e β -mercaptoetanol a 0,05 mM. O meio RPMI contendo 10% de FBS, 1% de antibióticos, glutamina a 2 mM e β -mercaptoetanol a 0,05 M é usado como meio de ensaio. Para preparar o ensaio, 100 μ l de meio de ensaio são colocados em cada cavidade de uma placa de cultura de tecido de fundo plano de 96 cavidades, com ligação ultra baixa (Costar® 3474), exceto pela primeira fileira. 200 μ l de muGM-CSF recombinante (5 ng/ml), ou uma quantidade molar equivalente da amostra, são colocadas nas cavidades na primeira fileira. As diluições em série a 1:2 através das fileiras da placa de microtítulo são feitas por transferência de 100 μ l da amostra para a cavidade seguinte na fileira e mistura começando a partir da primeira fileira. Uma fileira das cavidades contém somente 100 μ l de meio de ensaio (sem GM-CSF) como um controle negativo. As células MC/9 são contadas e diluídas até uma concentração de 5×10^4 células/ml. Para remover a citocina residual, as células são lavadas duas vezes com RPMI por centrifugação das células, aspiração do meio e re-suspensão delas novamente em RPMI novo. 100 μ l desta suspensão celular são adicionadas nas cavidades de uma placa de 96 cavidades (5×10^3 células/cavidade), a qual já contém 100 μ l do meio correspondente enriquecido com a proteína de fusão de rmuGM-CSF ou GM-CSF. Após 48 - 72 horas, 20 μ l de solução de MTT a 5 mg/ml (em PBS, filtrada), um substrato para a desidrogenase mitocondrial, são adicionados às células. 4 horas mais tarde, a placa é centrifugada a 2400 g por 10 minutos. O meio é aspirado e as células são lisadas por adição de 100 μ l de DMSO (Fluka 41641). Finalmente, as placas são lidas a 570 nm. Cada concentração é testada em triplicata.

Em uma modalidade preferida da invenção, a proteína de fusão de acordo com a invenção compreende o fragmento de anticorpo biespecífico ("diacorpo") scFv L19 (longo) tendo a seqüência de aminoácidos descrita em SEQ ID NO: 6.

5 Em uma outra modalidade preferida da invenção, a proteína de fusão de acordo com a invenção compreende o fragmento de anticorpo biespecífico ("diacorpo") L19 (curto) tendo a seqüência de amino descrita em SEQ ID NO: 7.

10 Em uma modalidade preferida adicional da invenção, a proteína de fusão é uma onde o anticorpo, o fragmento funcional ou o derivado funcional dele tendo afinidade de ligação específica a pelo menos um dos domínios extracelulares da tenascina oncofetal é selecionado a partir do grupo que consiste em F16 (longo), F16 (curto), F16 (A34M) (longo), F16 (A34M) (curto), G11 (longo) e G11 (curto) tendo as seqüências de amino descritas
15 em SEQ ID NO: 8 até 13, respectivamente.

 Mais preferivelmente, a proteína de fusão de acordo com a invenção é uma onde um membro do grupo que consiste em L19 (longo), L19 (curto), F16 (longo), F16 (curto), F16 (A34M) (longo), F16 (A34M) (curto), G11 (longo) e G11 (curto) está fundido a uma citocina selecionada a partir
20 do grupo que consiste em GM-CSF, IL-10, IL15 e IL-24, seus fragmentos funcionais e derivados funcionais.

 Para todas as modalidades e aspectos da presente invenção, prefere-se que a citocina seja uma citocina de murino ou humana, preferivelmente uma humana, seu fragmento funcional ou derivado funcional.

25 As proteínas de fusão de acordo com a invenção podem ser dispostas de modo tal que a citocina, o fragmento funcional ou o derivado funcional dela esteja fundido de modo N-terminal ou C-terminal ao anticorpo, ao fragmento funcional ou ao derivado funcional dele.

30 Foi surpreendentemente verificado que os derivados funcionais com ligadores curtos de L19, F16 e G11 resultam em uma formação aumentada de fragmentos de anticorpo biespecífico fragmentos de anticorpo biespecífico ("diacorpos"), quando comparados às variantes de ligadores lon-

gos. Além disso, foi surpreendentemente observado que as proteínas de fusão compreendendo scFv F16 (longo ou curto) com uma mutação na posição 34 na sequência de aminoácidos (A->M) (SEQ ID NOS: 10 e 11) demonstraram taxas de expressão muito maiores comparadas à sequência de scFv F16 regular.

Por causa das vantagens acima mencionadas das variantes curtas, estas proteínas de fusão de acordo com a invenção são preferidas, onde o fragmento de anticorpo ou o seu derivado funcional é selecionado a partir do grupo que consiste em L 19 (curto), F16 (curto), F16 (A34M) (curto) e G11 (curto).

As proteínas de fusão compreendendo a variante F16 (A34M) (longa ou curta) são mais preferidas e aquelas compreendendo a variante F16 (A34M) curta são mais preferidas.

Na verdade, em um aspecto independente, a presente invenção refere-se a uma proteína de fusão compreendendo:

(i) F16 (A34M) (curto ou longo, preferivelmente curto) tendo afinidade de ligação específica a pelo menos um dos domínios extracelulares da tenascina oncofetal, fundido a qualquer citocina, fragmentos funcionais e derivados funcionais dela.

Em uma modalidade preferida, as proteínas de fusão de acordo com a invenção são selecionadas a partir do grupo que consiste em L19-IL-10, IL15-L19, IL-24-L19, L19-GM-CSF, L19-IL15, IL24-L19.

Em uma outra modalidade preferida, as proteínas de fusão de acordo com a invenção são selecionadas a partir do grupo que consiste naquelas tendo a sequência de aminoácidos descrita em SEQ ID NO: 14-19.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso de uma proteína de fusão de acordo com a invenção para a fabricação de um medicamento.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção refere-se ao uso das proteínas de fusão acima mencionadas para o tratamento de câncer em um mamífero, preferivelmente em um ser humano.

Em uma outra modalidade preferida, a presente invenção refere-

se ao uso das proteínas de fusão acima mencionadas para o tratamento de doenças inflamatórias, preferivelmente das doenças inflamatórias crônicas, em um mamífero, preferivelmente em um ser humano.

De preferência, a doença inflamatória é selecionada a partir do grupo que consiste em psoríase, aterosclerose, artrite, preferivelmente artrite reumatóide.

Um aspecto adicional da presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos uma proteína de fusão da invenção e opcionalmente um excipiente farmaceuticamente aceitável.

As composições farmacêuticas da presente invenção tipicamente compreendem uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma proteína de fusão de acordo com a invenção e opcionalmente substâncias auxiliares, tais como excipiente(s) farmaceuticamente aceitável(is). As ditas composições farmacêuticas são preparadas em um modo bastante conhecido na técnica farmacêutica. Um veículo ou excipiente pode ser um material líquido que pode servir como um veículo ou meio para o ingrediente ativo. Os veículos ou os excipientes adequados são bastante conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, os estabilizantes, os antioxidantes, as substâncias reguladoras do pH, os excipientes de liberação controlada. A preparação farmacêutica da invenção pode ser adaptada, por exemplo, para uso parenteral e pode ser administrada ao paciente na forma de soluções ou similares.

Finalmente, um outro aspecto da presente invenção diz respeito a um método de tratamento, onde uma quantidade efetiva de uma composição farmacêutica é administrada a um paciente que necessita dela, preferivelmente um paciente sofrendo de câncer e/ou doenças inflamatórias.

Ao efetuar o tratamento de um paciente que sofre das doenças ou das condições descritas acima, uma proteína de fusão da presente invenção pode ser administrada em qualquer forma ou modo que torne biodisponível o composto terapêutico em uma quantidade efetiva, incluindo as rotas orais ou parenterais. Por exemplo, as composições da presente invenção podem ser administradas de modo subcutâneo, intramuscular, intravenoso e

similar. Alguém versado na técnica no campo de preparar formulações pode prontamente selecionar a forma e o modo adequados de administração, dependendo das características particulares do produto selecionado, da doença ou da condição a ser tratada, do estágio da doença ou da condição e de outras circunstâncias relevantes (vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (1990)). As composições da presente invenção podem ser administradas sozinhas ou na forma de uma preparação farmacêutica em combinação com veículos ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis, cuja proporção e natureza são determinadas pela solubilidade e pelas propriedades químicas do produto selecionado, pela rota de administração escolhida e pela prática farmacêutica padrão. Os produtos da presente invenção, embora efetivos eles próprios, podem ser formulados e administrados na forma de seus sais farmacêuticamente aceitáveis, tais como os sais de adição de ácidos ou os sais de adição de bases, para propósitos de estabilidade, conveniência de cristalização, solubilidade aumentada e similar.

Listagens das Seqüências

A SEQ ID NO: 1 mostra a seqüência de aminoácidos da IL-10 humana; nº de acesso: P22301 (SwissProt); Vieira e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88(4), 1172-1176 (1991).

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSR
VKTFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQ
DPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEK
GIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

A SEQ ID NO: 2 mostra a seqüência de aminoácidos da IL-15 humana; nº de acesso: P40933 (SwissProt); Grabstein e outros, Science 264 (5161), 965-968 (1994).

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLE
SGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHI
VQMFINTS

A SEQ ID NO: 3 mostra a seqüência de aminoácidos da IL-24 humana; nº de acesso: Q13007 (SwissProt); Jiang e outros, Oncogene 11

(12), 2477-2486 (1995).

AQGQEFHFGPCQVKGVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLLQQEVL
QNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLKSFSTLANNFVLIVS
QLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAALTALGEVDILLTWM
5 QKFYKL

A SEQ ID NO: 4 mostra a seqüência de aminoácidos do GM-CSF humano; nº de acesso: P04141 (SwissProt); Lee e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 (13), 4360-4364 (1985).

APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQE
10 PTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITF
ESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE

A SEQ ID NO: 5 mostra a seqüência de aminoácidos do GM-CSF de murino; nº de acesso: P01587 (SwissProt); Miyatake e outros, EMBO J. 4 (10), 2561-2568 (1985).

15 APTTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTCTV
QTRLKIFEQGLRGNF TKLKGALNMTASYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFI
DSLKTFLTIDIPFECKKPVQK

A SEQ ID NO: 6 mostra a seqüência de aminoácidos do L19 (longo); Viti e outros, Cancer Res., 59(2): 347-52 (1999).

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVS
SISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPF
PYFDYWGGGTLVTVSSGDGSSGGSGGASTGEIVLTQSPGTL SLSPGERAT
LSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQG TKVEIK

25 (As letras em **negrito** indicam o ligador de 14 aminoácidos)

A SEQ ID NO: 7 mostra a seqüência de aminoácidos do L19 (curto) (ainda não publicada).

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVS
SISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPF
30 PYFDYWGGGTLVTVSSGSSGGGEIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSV
SSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQG TKVEIK

(As letras em **negrito** indicam o ligador de 5 aminoácidos.)

A SEQ ID NO: 8 mostra a seqüência de aminoácidos do F16 (longo).

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGASWVRQAPGKGLEWVS
 5 AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAH
 NAFDYWGQGTLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQTV
 RITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGN
 TASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPPVVF~~GGG~~TKLTVLG

10 A SEQ ID NO: 9 mostra a seqüência de aminoácidos do F16 (curto).

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGASWVRQAPGKGLEWVS
 AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAH
 NAFDYWGQGTLVTVSRGSSGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRS
 YYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAE
 15 DEADYYCNSSVYTMPPVVF~~GGG~~TKLTVLG

(As letras em **negrito** indicam o ligador de 5 aminoácidos.)

A SEQ ID NO: 10 mostra a seqüência de aminoácidos do F16(A34M) (longo).

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS
 20 AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAH
 NAFDYWGQGTLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQTV
 RITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGN
 TASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPPVVF~~GGG~~TKLTVLG

(O aminoácido sublinhado indica a substituição de A por M.)

25 A SEQ ID NO: 11 mostra a seqüência de aminoácidos do F16(A34M) (curto).

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS
 AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAH
 NAFDYWGQGTLVTVSRGSSGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRS
 30 YYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAE
 DEADYYCNSSVYTMPPVVF~~GGG~~TKLTVLG

(O aminoácido sublinhado indica a substituição de A por M. As letras em **ne-**

grito indicam o ligador de 5 aminoácidos.)

A SEQ ID NQ: 12 mostra a sequência de aminoácidos do G11 (longo).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSRMGWVRQAPGKGLEWV
 5 SAINEEGGQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKH
 PPHRPFDYWGQGTLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALG
 QTVRITCQGDSLRLYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSS
 GNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSHGPRRPVVFGGGTKLTVLG

A SEQ ID NO: 13 mostra a sequência de aminoácidos do G11 (curto).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSRMGWVRQAPGKGLEWV
 SAINEEGGQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKH
 PPHRPFDYWGQGTLVTVSRGSSGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDS
 LRLYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 15 QAEDEADYYCNSSHGPRRPVVFGGGTKLTVLG

A SEQ ID NO: 14 mostra a sequência de aminoácidos da proteína de fusão L19 (longo) - hull-10:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVS
 SISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPF
 20 PYFDYWGGGTLVTVSSGDGSSGGSGGASTGEIVLTQSPGTL SLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGT
 DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQG TKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSS
 GSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTF FQMKDQLDNLLLK
 ESLLDFKGYLG CQALSEMIQFYLEE VMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKT
 25 LRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKG IYKAMSEFDIFINYIEAY
 MTMKIRN

A SEQ ID NO: 15 mostra a sequência de aminoácidos da proteína de fusão L19 (curto) - hull15:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVS
 30 SISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPF
 PYFDYWGGGTLVTVSSGSSGGGEIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSV
 SSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP

EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSSGNWVNVISDL
KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT
VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

A SEQ ID NO: 16 mostra a seqüência de aminoácidos da proteí-

5 na de fusão hull15 - L19 (curto):

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLE
SGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHI
VQMFINTSSSSSGSSSSSGSSSSSGEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKN
10 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQGLTVTVSSGSSSGGEIVLTQ
SPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

A SEQ ID NO: 17 mostra a seqüência de aminoácidos da proteí-

na de fusão hull24-L19 (curto):

15 AQQQEFHFGPCQVKGVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLLQQEVL
QNVSDAESCYLVTLLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLKSFSTLANNFVLIVS
QLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAALTKALGEVDILLTWM
QKFYKLSSSSSGSSSSSGSSSSSGEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF
SSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTL
20 YLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQGLTVTVSSGSSSGGEIVLTQSP
GTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGI
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

A SEQ ID NO: 18 mostra a seqüência de aminoácidos da proteí-

na de fusão L19 (curto) huGM-CSF:

25 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVS
SISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPF
PYFDYWGGQGLTVTVSSGSSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSV
SSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSSSGAPARSPSPS
30 TQPWEHVNAIQEARRLLNLSRD TAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLE
LYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS CATQIITFESFKENLKD
FLLVIPFDCWEPVQE

A SEQ ID NO: 19 mostra a sequência de aminoácidos da proteína de fusão L19 (curto) - GM-CSF de murino:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVS
 SISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPF
 5 PYFDYWGGQTLVTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSV
 SSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGAPTRSPITV
 TRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTCVQTRLKIFEQ
 GLRGNFTKLKGALNMTASYYYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFDLSLKTFLT
 10 IPFECKKPVQK

Figuras

Figura 1 ilustra o acúmulo das proteínas de fusão nos tumores F9 subcutâneos, nos camundongos 129Sv. Os dados de biodistribuição demonstram que todas as quatro proteínas de fusão têm uma captação mais elevada no tumor comparado aos órgãos normais. Os dados em 24 h após a
 15 injeção das proteínas radiomarcadas são mostrados para: A) L19-IL10, B) IL15-L19, C) IL24-L19, D) L19-GMCSF e E) L19-IL15.

Figura 2 Imageamento por Infravermelho Próximo mediado por Anticorpo dos camundongos artríticos. Os animais foram injetados com
 20 SIP(L19)-Alexa750 (a), SIP(G11)-Alexa750 (b) ou SIP de controle-Alexa750 (c). As fotos foram tiradas 24 h após a injeção dos anticorpos marcados fluorescentemente. As setas indicam o inchaço de grau 2 nas patas da frente dos camundongos.

Figura 3 Acúmulo de SIP(L19) e SIP(G11) radiomarcados nas
 25 patas artríticas. O painel A mostra as extremidades artríticas de um camundongo injetado com SIP(L19)-¹²⁵I. A pata da esquerda foi classificada como artrite de grau 2, a pata da direita como de grau 1. O painel B mostra o mesmo experimento com SIP(G11)-¹²⁵I. Aqui, a pata da esquerda foi classificada como artrite de grau 1, a pata da direita como de grau 2. O painel C
 30 mostra um camundongo injetado com SIP de controle-¹²⁵I, um anticorpo que não se liga a nenhuma estrutura no camundongo. Aqui, a pata da esquerda foi classificada como artrite de grau 2, a pata da direita como de grau 1.

Figura 4 ilustra o alveijamento das citocinas para as lesões artríticas. Os camundongos artríticos foram injetados intravenosamente (i.v.) na veia da cauda lateral com solução salina (círculos pretos), com L19-IL2 (triângulos pretos, linha tracejada), com L19-TNF α (cruzes, linha tracejada) ou com L19-IL10 (quadrados abertos) diluído em um volume de 200 μ l de solução salina. As injeções foram iniciadas no dia 1, após o início da artrite, e então repetidas de dois em dois dias por 3 injeções por animal, conforme indicado pelas setas. As doses cumulativas para as proteínas de fusão eram: 20 μ g equivalentes de IL2, 6 μ g equivalentes de TNF α e 150 μ g equivalentes de IL10 por camundongo, respectivamente. A pontuação artrítica foi avaliada diariamente e foi expressa como a média $\pm$ SEM. O inchaço das patas foi medido de dois em dois dias e a média de todas as 4 patas foi especificada como espessura da pata para cada animal. Os resultados mostrados são a média $\pm$ SEM de cada grupo. Cada grupo consistia em 7 camundongos.

Figura 5 demonstra que a distribuição alvejada de IL10 aos locais de inflamação é superior ao tratamento de IL10 sistêmico. Os camundongos artríticos foram injetados intravenosamente (i.v.) na veia da cauda lateral com solução salina (círculos pretos), com L19-IL10 (quadrados abertos) ou com HyHel10-IL10 (cruzes, linha tracejada) diluído em um volume de 200 μ l de solução salina. As injeções foram iniciadas no dia 1 do início da artrite e então repetidas de dois em dois dias por 3 injeções por animal, conforme indicado pelas setas. As doses cumulativas para as proteínas de fusão eram 150 μ g equivalentes de IL10 por camundongo. A pontuação artrítica foi avaliada diariamente e foi expressa como a média $\pm$ SEM. O inchaço das patas foi medido de dois em dois dias e a média de todas as 4 patas foi especificada como espessura da pata para cada animal. Os resultados mostrados são a média $\pm$ SEM de cada grupo. Cada grupo continha 6 camundongos.

Figura 6 ilustra a terapia dos tumores F9 s.c. com diferentes quantidades de L19-GM-CSF. As injeções i.v. diárias por quatro dias consecutivos (setas) com 60 μ g de L19-GM-CSF demonstraram retardo significati-

vo do crescimento do tumor comparado ao grupo tratado com solução salina (PBS).

Figura 7 ilustra a terapia dos tumores F9 s.c. com L19-IL15. As injeções i.v. diárias por quatro dias consecutivos (setas) com 50 µg de L19-IL15 demonstraram retardo significativo do crescimento do tumor comparado ao grupo de controle (PBS).

Figura 8 ilustra a terapia dos tumores F9 s.c. com IL24-L19. As injeções i.v. diárias por quatro dias consecutivos (setas) com 50 µg de IL24-L19 mostraram retardo significativo do crescimento do tumor comparado ao grupo de controle (PBS).

Exemplos

Exemplo 1 - Preparação ds proteínas de fusão

As citocinas foram fundidas geneticamente à extremidade de C ou à de N dos fragmentos de anticorpos scFv separados por um ligador de 15 aminoácidos. Os fragmentos resultantes, precedidos por uma seqüência de secreção requerida para a secreção de proteínas recombinantes, foram clonados em um vetor de expressão de mamífero e as proteínas de fusão foram expressas em células HEK 293 estavelmente transfectadas. As construções foram purificadas a partir do meio de cultura através de cromatografia por afinidade sobre colunas de antígeno, em rendimentos de 1-2 mg/l. O controle de qualidade foi efetuado por SDS-PAGE e filtração em gel.

Exemplo 2 - Formulação e administração das proteínas de fusão

As proteínas de fusão são resolvidas em soluções fisiológicas e administradas intravenosamente aos animais. As proteínas são armazenadas em um dos seguintes tampões, dependendo do seu ponto isoelétrico e do tempo de armazenagem desejado. As proteínas são mantidas por um armazenamento de longo tempo (mais de um mês) em menos 80°C. Para impedir a agregação pelos ciclos repetidos de descongelamento e congelamento, o Glicerol a 1% e o Tween 80 a 0,04% podem ser adicionados.

PBS (solução salina tamponada com fosfato): NaCl a 100 mM, Na₂HPO₄ a 30 mM x 2 H₂O, NaH₂PO₄ a 20 mM x 2 H₂O, pH 7,4

K-PBS: NaCl a 137 mM, Na₂HPO₄ a 8 mM, x 2 H₂O, KCl a 2,7 mM, KH₂PO₄

a 1,5 mM, pH 7,4

PBS Siena: NaCl a 20 mM, Na₂HPO₄ a 6,7 mM x 2 H₂O, KCl a 1,8 mM, Manitol a 133 mM, pH 6,3

TBS (solução salina tamponada com Tris): Tris a 20 mM, NaCl a 130 mM,
5 pH 8,2

As injeções são tipicamente administradas 3-5 vezes, diariamente ou de dois em dois dias. A dosagem é selecionada de acordo com os valores da literatura, seguindo experimentação de rotina.

Exemplo 3 - Eficácia de alveijamento da proteína de fusão em camundongos

10 129Sv enxertados com tumores F9 subcutâneos

As propriedades de alveijamento *in vivo* de uma preparação radioiodada de L19-IL10 foram avaliadas em um experimento de biodistribuição em camundongos 129SvEv carregando os teratocarcinomas F9 subcutâneos. As razões de tumor/órgão favoráveis (variando entre 7:1 e 128:1)
15 foram observadas 24 horas após a administração intravenosa. As propriedades de alveijamento *in vivo* das preparações radioiodadas de L19-IL15, IL15-L19, IL24-L19 e L19-GM-CSF foram avaliadas em um experimento de biodistribuição em camundongos 129SvEv carregando os teratocarcinomas F9 subcutâneos. As razões de tumor:órgão favoráveis foram observadas 24
20 horas após a administração intravenosa.

Exemplo 4 - Os anticorpos monoclonais humanos L19 e G11 acumulam-se seletivamente nos locais de artrite

O desempenho de alveijamento *in vivo* de L19 e G11 no formato de minianticorpos (Borsi e outros, Int. J. Cancer, 102(1): 79-85 (2002)) foi
25 estudado em camundongos artríticos usando tanto a fluorescência quanto a radioatividade para a detecção do anticorpo.

Os camundongos artríticos foram injetados com SIP(L19), SIP(G11) ou SIP de controle marcado com o corante de infravermelho próximo Alexa 750. Vinte e quatro horas após a injeção intravenosa, os animais
30 foram representados por imagens usando um dispositivo formador de imagens de fluorescência no infravermelho, revelando um acúmulo forte e seletivo de anticorpos nas lesões presentes no membro artrítico no caso de

SIP(L19) e SIP(G11) [Figura 2]. Em contraste, os camundongos injetados com SIP de controle, um anticorpo de especificidade irrelevante no camundongo, o qual foi usado como controle negativo, mostraram somente um sinal de fluorescência fraco, devido ao extravasamento não específico do anticorpo marcado através dos vasos que vazam na extremidade inflamada.

Os camundongos artríticos foram injetados com SIP(L19) e SIP(G11) marcados de modo radioativo. Após 24 h, os camundongos foram sacrificados e as patas foram representadas por imagens através de autoradiografia. Um acúmulo preferencial de radioatividade foi observado nas extremidades inflamadas dos camundongos injetados com SIP(L19) e SIP(G11), enquanto que nenhum acúmulo de anticorpo preferencial pôde ser detectado nos camundongos exibindo graus comparáveis de inflamação, os quais tinham sido injetados com anticorpo SIP de especificidade irrelevante no camundongo [Figura 3].

Exemplo 5 - Eficácia terapêutica da proteína de fusão L19-IL10 no modelo de camundongo de artrite induzida por colágeno

O modelo de animal mais amplo usado e melhor conhecido para a artrite reumatóide é a artrite induzida por colágeno (CIA) do tipo II em camundongo ou rato [Bliven e outros, *Arthritis Rheum.* 29(9): 1131-8 ((1986)]. Este modelo foi descrito ter diversas características em comum com a artrite reumatóide (RA) em seres humanos, incluindo as respostas imunológicas humorais e celulares ao colágeno, a ligação aos genes que residem no *locus* de histocompatibilidade maior e algumas manifestações histológicas similares. Maine e Feldmann efetuaram a maior parte deste trabalho pioneiro, tal como a investigação dos anticorpos antifator de necrose tumoral como uma estratégia terapêutica para a RA, usando este modelo de animal [Williams e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(20): 9784-8 (1992); Williams e outros, *J. Immunol.* 165(12): 7240-5 (2000)].

Efeito da Distribuição Alvejada de Citocinas para as Lesões Artríticas:

Em um primeiro experimento, o potencial terapêutico da L19-IL10 foi comparado àquele de L19-IL2 e L19-TNF, usando camundongos com CIA. Os camundongos injetados com solução salina foram usados co-

mo um grupo de controle. Os camundongos receberam três injeções a cada 48 h, começando no dia 1 após o início da artrite. As doses cumulativas, que eram iguais às anteriormente usadas para os experimentos de terapia de tumor, foram 60 µg de L19-IL2 e 15 µg de L19-TNF. 450 µg de L19-IL10 por camundongo foram usados neste experimento e nos experimentos subsequentes com as proteínas de fusão de anticorpo-IL10, de acordo com as doses de IL10 anteriormente verificadas serem ativas e não tóxicas nos camundongos.

A L19-IL10 teve um efeito terapêutico claro sobre a pontuação artrítica e sobre o inchaço da pata (vide a Figura 4). A magnitude deste efeito foi comparável àquela observada para os anticorpos que neutralizam o TNF no mesmo modelo de animal. Em contraste, a L19-IL2 e a L19-TNF resultaram em um inchaço rápido e pronunciado dos membros afetados, que foi mais grave do que no grupo de controle com solução salina. Nenhum dos animais tratados morreu ou exibiu uma perda de peso de mais do que 15% e os parâmetros artríticos não pioraram significativamente após a terceira administração de anticorpo (Figura 4).

Comparação da Distribuição Alvejada Comparada com a Aplicação Sistêmica de IL10:

Para demonstrar uma vantagem terapêutica de uma versão alvejada de IL10, quando comparada à citocina não alvejada, as duas proteínas de fusão L19-IL10 e HyHal10-IL10 foram investigadas no modelo de artrite CIA. Como no experimento anterior, os grupos de 6 camundongos artríticos foram tratados com três injeções de L19-IL10, HyHal10-IL10 ou solução salina de dois em dois dias, começando no primeiro dia do início da artrite. Para ambas as proteínas de fusão, a dose cumulativa administrada a cada camundongo foi 450 µg. Conforme esperado, a L19-IL10 demonstrou uma resposta terapêutica significativa quando comparada ao grupo de controle com solução salina, com a pontuação artrítica e o inchaço da pata permanecendo baixo até o dia 9 após o início da artrite (isto é, 4 dias após a última injeção). Consistente com as observações anteriores de uma atividade terapêutica da IL10 neste modelo, a proteína de fusão HyHEL10-IL10 mostrou um benefício

terapêutico comparado ao controle com solução salina, o qual não era, entretanto, tão eficiente quanto no caso de L19-IL10 (figura 5).

Exemplo 6 - Eficácia terapêutica das proteínas de fusão L19-IL15, IL24-L19 e L19-GM-CSF em camundongos 129Sv enxertados com tumores F9 subcutâneos

Neste primeiro experimento, o potencial terapêutico de L19-GM-CSF, L19-IL15 e IL24-L19 foi avaliado usando camundongos com tumores F9 s.c. Os camundongos injetados com solução salina foram usados como um grupo de controle. Os camundongos receberam um total de quatro injeções a cada 24 h, começando no dia 4 após o implante da célula de tumor, quando os tumores já estavam visíveis e eram mensuráveis. As doses cumulativas, as quais eram iguais às anteriormente usadas para os experimentos de terapia de tumor, foram 240 µg para L19-GM-CSF, 200 µg para L19-IL15 e 200 µg para IL24-L19. Todas as três proteínas de fusão eram não-tóxicas neste meio e demonstraram um retardo significativo do crescimento do tumor comparado ao grupo de controle (Figuras 6-8).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Philogen S.p.A.
 <120> CITOCINAS COM ANTICORPOS ALVEJADOS PARA TERAPIA
 <130> RP50020PCT
 5 <160> 19
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 178
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
 1 5 10 15
 Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
 15 20 25 30
 Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
 35 40 45
 Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
 50 55 60
 20 Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
 65 70 75 80
 Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
 85 90 95
 Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu
 25 100 105 110
 Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
 115 120 125
 Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
 130 135 140
 30 Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
 145 150 155 160
 Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile

	165	170	175
	Arg Asn		
	<210> 2		
	<211> 114		
5	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 2		
	Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile		
	1	5	10 15
10	Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His		
	20	25	30
	Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln		
	35	40	45
	Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu		
15	50	55	60
	Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val		
	65	70	75 80
	Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile		
	85	90	95
20	Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn		
	100	105	110
	Thr Ser		
	<210> 3		
	<211> 158		
25	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 3		
	Ala Gln Gly Gln Glu Phe His Phe Gly Pro Cys Gln Val Lys Gly Val		
	1	5	10 15
30	Val Pro Gln Lys Leu Trp Glu Ala Phe Trp Ala Val Lys Asp Thr Met		
	20	25	30
	Gln Ala Gln Asp Asn Ile Thr Ser Ala Arg Leu Leu Gln Gln Glu Val		

	35	40	45
	Leu Gln Asn Val Ser Asp Ala Glu Ser Cys Tyr Leu Val His Thr Leu		
	50	55	60
	Leu Glu Phe Tyr Leu Lys Thr Val Phe Lys Asn Tyr His Asn Arg Thr		
5	65	70	75
	Val Glu Val Arg Thr Leu Lys Ser Phe Ser Thr Leu Ala Asn Asn Phe		80
	85	90	95
	Val Leu Ile Val Ser Gln Leu Gln Pro Ser Gln Glu Asn Glu Met Phe		
	100	105	110
10	Ser Ile Arg Asp Ser Ala His Arg Arg Phe Leu Leu Phe Arg Arg Ala		
	115	120	125
	Phe Lys Gln Leu Asp Val Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Leu Gly Glu		
	130	135	140
	Val Asp Ile Leu Leu Thr Trp Met Gln Lys Phe Tyr Lys Leu		
15	145	150	155
	<210> 4		
	<211> 127		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 4		
	Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val		
	1	5	10
	Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr		15
	20	25	30
25	Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp		
	35	40	45
	Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln		
	50	55	60
	Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met		
30	65	70	75
	Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys		80
	85	90	95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110
Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125

5 <210> 5
<211> 124
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 5

10 Ala Pro Thr Arg Ser Pro Ile Thr Val Thr Arg Pro Trp Lys His Val
1 5 10 15
Glu Ala Ile Lys Glu Ala Leu Asn Leu Leu Asp Asp Met Pro Val Thr
20 25 30
Leu Asn Glu Glu Val Glu Val Val Ser Asn Glu Phe Ser Phe Lys Lys
15 35 40 45
Leu Thr Cys Val Gln Thr Arg Leu Lys Ile Phe Glu Gln Gly Leu Arg
50 55 60
Gly Asn Phe Thr Lys Leu Lys Gly Ala Leu Asn Met Thr Ala Ser Tyr
65 70 75 80

20 Tyr Gln Thr Tyr Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Asp Cys Glu Thr Gln
85 90 95
Val Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Ile Asp Ser Leu Lys Thr Phe Leu Thr
100 105 110
Asp Ile Pro Phe Glu Cys Lys Lys Pro Val Gln Lys

25 115 120
<210> 6
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> L19 (long)
<400> 6

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 5 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 10 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 15 Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
 115 120 125
 Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
 130 135 140
 Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
 20 145 150 155 160
 Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 165 170 175
 Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
 180 185 190
 25 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 195 200 205
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg
 210 215 220
 Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 30 225 230 235
 <210> 7
 <211> 229

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> L19 (short)

5 <400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

20 25 30

10 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

15 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

20 Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser

115 120 125

Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

130 135 140

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

25 145 150 155 160

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg

165 170 175

Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

180 185 190

30 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr

195 200 205

Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr

	210	215	220
	Lys Val Glu Ile Lys		
	225		
	<210> 8		
5	<211> 239		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> F16 (long)		
10	<400> 8		
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr		
	20 25 30		
15	Gly Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
20	65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85 90 95		
	Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
	100 105 110		
25	Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
	115 120 125		
	Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu		
	130 135 140		
	Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr		
30	145 150 155 160		
	Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val		
	165 170 175		

Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 180 185 190
 Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln
 195 200 205
 5 Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met
 210 215 220
 Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230 235
 <210> 9
 10 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> F16 (short)
 15 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 20 Gly Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 25 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 30 Thr Val Ser Arg Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp
 115 120 125
 Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln

	130		135		140	
	Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro					
	145		150		155	160
	Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser					
5		165		170		175
	Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser					
		180		185		190
	Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys					
		195		200		205
10	Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr					
		210		215		220
	Lys Leu Thr Val Leu Gly					
	225		230			
	<210> 10					
15	<211> 239					
	<212> PRT					
	<213> Artificial					
	<220>					
	<223> F16(A34M) (long)					
20	<400> 10					
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
	1	5		10		15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr					
		20		25		30
25	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
		35		40		45
	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val					
		50		55		60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr					
30	65		70		75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
		85		90		95

Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125
5 Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu
130 135 140
Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val
10 165 170 175
Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
180 185 190
Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln
195 200 205
15 Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met
210 215 220
Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230 235
<210> 11
20 <211> 230
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> F16(A34M) (short)
25 <400> 11
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
30 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65	70	75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
5	85	90	95
	Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
	100	105	110
	Thr Val Ser Arg Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp		
	115	120	125
10	Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln		
	130	135	140
	Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro		
	145	150	155 160
	Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser		
15	165	170	175
	Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser		
	180	185	190
	Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys		
	195	200	205
20	Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr		
	210	215	220
	Lys Leu Thr Val Leu Gly		
	225	230	
	<210> 12		
25	<211> 241		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> G11(long)		
30	<400> 12		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30
 Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 5 Ser Ala Ile Asn Glu Glu Gly Gly Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Ala Lys His Pro Pro His Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 15 Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
 130 135 140
 Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 Leu Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
 20 165 170 175
 Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 180 185 190
 Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
 195 200 205
 25 Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser His Gly
 210 215 220
 Pro Arg Arg Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 225 230 235 240
 Gly
 30 <210> 13
 <211> 232
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> G11(short)

<400> 13

5 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30
Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
10 35 40 45
Ser Ala Ile Asn Glu Glu Gly Gly Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
15 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys His Pro Pro His Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr
20 115 120 125
Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr
130 135 140
Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Leu Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln
145 150 155 160
25 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg
165 170 175
Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr
180 185 190
Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
30 195 200 205
Tyr Cys Asn Ser Ser His Gly Pro Arg Arg Pro Val Val Phe Gly Gly
210 215 220

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230
 <210> 14
 <211> 413
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fusion protein L19(long) - huIL-10
 <400> 14
 10 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 15 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
 25 115 120 125
 Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
 130 135 140
 Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
 145 150 155 160
 30 Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 165 170 175
 Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg

	180	185	190
	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg		
	195	200	205
	Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg		
5	210	215	220
	Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser		
	225	230	235
	Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Pro Gly		
	245	250	255
10	Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu		
	260	265	270
	Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr		
	275	280	285
	Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser		
15	290	295	300
	Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu		
	305	310	315
	Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln		
	325	330	335
20	Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys		
	340	345	350
	Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu		
	355	360	365
	Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu		
25	370	375	380
	Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile		
	385	390	395
	Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn		
	405	410	
30	<210> 15		
	<211> 358		
	<212> PRT		

<213> Artificial

<220>

<223> Fusion protein L19(short) - huIL15

<400> 15

```

5  Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
   1             5             10             15
   Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
           20             25             30
   Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
10             35             40             45
   Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
           50             55             60
   Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
   65             70             75             80
15  Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85             90             95
   Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
           100            105            110
   Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
20             115            120            125
   Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
           130            135            140
   Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
   145            150            155            160
25  Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg
           165            170            175
   Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
           180            185            190
   Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
30             195            200            205
   Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
           210            215            220

```

Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile
 245 250 255
 5 Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
 275 280 285
 Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
 10 290 295 300
 Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser
 305 310 315 320
 Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
 325 330 335
 15 Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
 340 345 350
 Met Phe Ile Asn Thr Ser
 355
 <210> 16
 20 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fusion protein huIL15 - L19(short)
 25 <400> 16
 Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
 1 5 10 15
 Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 20 25 30
 30 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 35 40 45
 Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu

	50		55		60											
	Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Val
	65				70					75						80
	Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ile
5					85					90					95	
	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	Met	Phe	Ile	Asn
					100					105					110	
	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser
					115					120					125	
10	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
					130					135					140	
	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser
	145					150					155				160	
	Phe	Ser	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
15					165					170					175	
	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser
					180					185					190	
	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu
					195					200					205	
20	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
					210					215					220	
	Cys	Ala	Lys	Pro	Phe	Pro	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
	225					230					235				240	
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln
25					245					250					255	
	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser
					260					265					270	
	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln
					275					280					285	
30	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Ser
					290					295					300	
	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr

305 310 315 320
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val
 325 330 335
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly
 5 340 345 350
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 355
 <210> 17
 <211> 402
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fusion protein huIL24 - L19(short)
 <400> 17
 15 Ala Gln Gly Gln Glu Phe His Phe Gly Pro Cys Gln Val Lys Gly Val
 1 5 10 15
 Val Pro Gln Lys Leu Trp Glu Ala Phe Trp Ala Val Lys Asp Thr Met
 20 25 30
 Gln Ala Gln Asp Asn Ile Thr Ser Ala Arg Leu Leu Gln Gln Glu Val
 20 35 40 45
 Leu Gln Asn Val Ser Asp Ala Glu Ser Cys Tyr Leu Val His Thr Leu
 50 55 60
 Leu Glu Phe Tyr Leu Lys Thr Val Phe Lys Asn Tyr His Asn Arg Thr
 65 70 75 80
 25 Val Glu Val Arg Thr Leu Lys Ser Phe Ser Thr Leu Ala Asn Asn Phe
 85 90 95
 Val Leu Ile Val Ser Gln Leu Gln Pro Ser Gln Glu Asn Glu Met Phe
 100 105 110
 Ser Ile Arg Asp Ser Ala His Arg Arg Phe Leu Leu Phe Arg Arg Ala
 30 115 120 125
 Phe Lys Gln Leu Asp Val Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Leu Gly Glu
 130 135 140

	Val	Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Trp	Met	Gln	Lys	Phe	Tyr	Lys	Leu	Ser	Ser
	145					150					155					160
	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Glu	Val	Gln
					165					170					175	
5	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg
					180					185				190		
	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Ser	Met	Ser
			195					200					205			
	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile
10		210						215					220			
	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
	225					230					235					240
	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met
					245					250					255	
15	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Pro
					260					265				270		
	Phe	Pro	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			275						280					285		
	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr
20		290						295						300		
	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser
	305					310					315					320
	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
					325					330					335	
25	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly
					340					345				350		
	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu
			355						360				365			
	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln
30		370						375					380			
	Gln	Thr	Gly	Arg	Ile	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
	385					390					395					400

Ile Lys

<210> 18

<211> 371

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Fusion Protein L19(short) - huGM-CSF

<400> 18

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

10 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

15 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser

115 120 125

25 Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

130 135 140

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

145 150 155 160

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg

30 165 170 175

Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

180 185 190

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 195 200 205
 Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 210 215 220
 5 Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Gly Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro
 245 250 255
 Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu
 10 260 265 270
 Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser
 275 280 285
 Glu Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu
 290 295 300
 15 Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro
 305 310 315 320
 Leu Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro
 325 330 335
 Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu
 20 340 345 350
 Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro
 355 360 365
 Val Gln Glu
 370
 25 <210> 19
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Fusion protein L19(short) - murine GM-CSF
 <400> 19
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

	1		5		10		15									
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe
				20					25					30		
	Ser	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
5			35					40					45			
	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50					55					60			
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75				80	
10	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90				95		
	Ala	Lys	Pro	Phe	Pro	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				100						105				110		
	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser
15			115					120					125			
	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
			130					135					140			
	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln
	145					150					155				160	
20	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Ser	Arg
						165					170				175	
	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
				180						185				190		
	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr
25			195					200					205			
	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Gly	Arg	Ile	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
			210					215					220			
	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser
	225					230					235				240	
30	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Pro	Thr	Arg	Ser	Pro	Ile	Thr	Val	Thr	Arg	Pro
						245					250				255	
	Trp	Lys	His	Val	Glu	Ala	Ile	Lys	Glu	Ala	Leu	Asn	Leu	Leu	Asp	Asp

	260	265	270
	Met Pro Val Thr Leu Asn Glu Glu Val Glu Val Val Ser Asn Glu Phe		
	275	280	285
	Ser Phe Lys Lys Leu Thr Cys Val Gln Thr Arg Leu Lys Ile Phe Glu		
5	290	295	300
	Gln Gly Leu Arg Gly Asn Phe Thr Lys Leu Lys Gly Ala Leu Asn Met		
	305	310	315
	Thr Ala Ser Tyr Tyr Gln Thr Tyr Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Asp		
	325	330	335
10	Cys Glu Thr Gln Val Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Ile Asp Ser Leu Lys		
	340	345	350
	Thr Phe Leu Thr Asp Ile Pro Phe Glu Cys Lys Lys Pro Val Gln Lys		
	355	360	365

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão compreendendo:

- (i) um anticorpo, seu fragmento funcional ou derivado funcional tendo afinidade de ligação específica ao domínio extracelular da fibronectina oncofetal (ED-B) ou a pelo menos um dos domínios extracelulares da tenascina oncofetal, fundido a
- (ii) uma citocina selecionada a partir do grupo que consiste em (a) IL-10, (b) IL15, (c) IL-24 e (d) GM-CSF, fragmentos funcionais e derivados funcionais dos mesmos.

2. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo, o fragmento ou o derivado funcional do mesmo é selecionado a partir do grupo consistindo em anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos com CDR enxertada, fragmentos Fv, fragmentos Fab, fragmentos Fab₂ e proteínas de ligação similares aos anticorpos.

3. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o derivado funcional do anticorpo é o fragmento de anticorpo biespecífico ("diacorpo") L19 (longo) tendo a seqüência de aminoácidos descrita em SEQ ID NO: 6.

4. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o derivado funcional do anticorpo é o fragmento de anticorpo biespecífico ("diacorpo") L19 (curto) tendo a seqüência de amino descrita em SEQ ID NO: 7.

5. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o anticorpo, o fragmento funcional ou o derivado funcional do mesmo tendo afinidade de ligação específica a pelo menos um dos domínios extracelulares da tenascina oncofetal é selecionado a partir do grupo que consiste em F16 (longo), F16 (curto), F16 (A34M) (longo), F16 (A34M) (curto), G11 (longo) e G11 (curto) tendo as seqüências de amino descritas em SEQ ID NO: 8 até 13, respectivamente.

6. Proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que um membro do grupo que consiste em L19 (longo),

L19 (curto), F16 (longo), F16 (curto), F16 (A34M) (longo), F16 (A34M) (curto), G11 (longo) e G11 (curto) está fundido a uma citocina selecionada a partir do grupo que consiste em GM-CSF, IL-10, IL15 e IL-24, seus fragmentos funcionais e derivados funcionais dos mesmos.

5 7. Proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a citocina é uma citocina de murino ou humana, preferivelmente uma humana, fragmento funcional ou derivado funcional do mesmo.

10 8. Proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a citocina, o fragmento funcional ou o derivado funcional do mesmo está fundido de modo N-terminal ou C-terminal, preferivelmente de modo N-terminal, ao anticorpo, ao fragmento funcional ou ao derivado funcional do mesmo.

15 9. Proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o fragmento de anticorpo ou o seu derivado funcional é selecionado a partir do grupo que consiste em L 19 (curto), F16 (curto), F16 (A34M) (curto) e G11 (curto), preferivelmente F16 (A34M) (curto).

20 10. Proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, selecionada a partir do grupo que consiste em L19-IL-10, IL15-L19, IL-24-L19, L19-GM-CSF, L19-IL15, IL24-L19.

11. Proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 selecionada a partir do grupo que consiste naquelas tendo a seqüência de aminoácidos descrita em SEQ ID NO: 14-19.

25 12. Uso de uma proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 para a fabricação de um medicamento.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12 para o tratamento de câncer em um mamífero, preferivelmente em um ser humano.

30 14. Uso de acordo com a reivindicação 12 para o tratamento de doenças inflamatórias, preferivelmente das doenças inflamatórias crônicas, em um mamífero, preferivelmente em um ser humano.

15. Uso de acordo com a reivindicação 14, em que a doença inflamatória é selecionada a partir do grupo que consiste em psoríase, ate-

rosclerose, artrite, preferivelmente artrite reumatóide.

16. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos uma proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 e opcionalmente um excipiente farmaceuticamente aceitável.

- 5 17. Método de tratamento, em que uma quantidade efetiva de uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 16 é administrada a um paciente que necessita do mesmo, preferivelmente um paciente sofrendo de câncer e/ou doenças inflamatórias.

Fig. 1

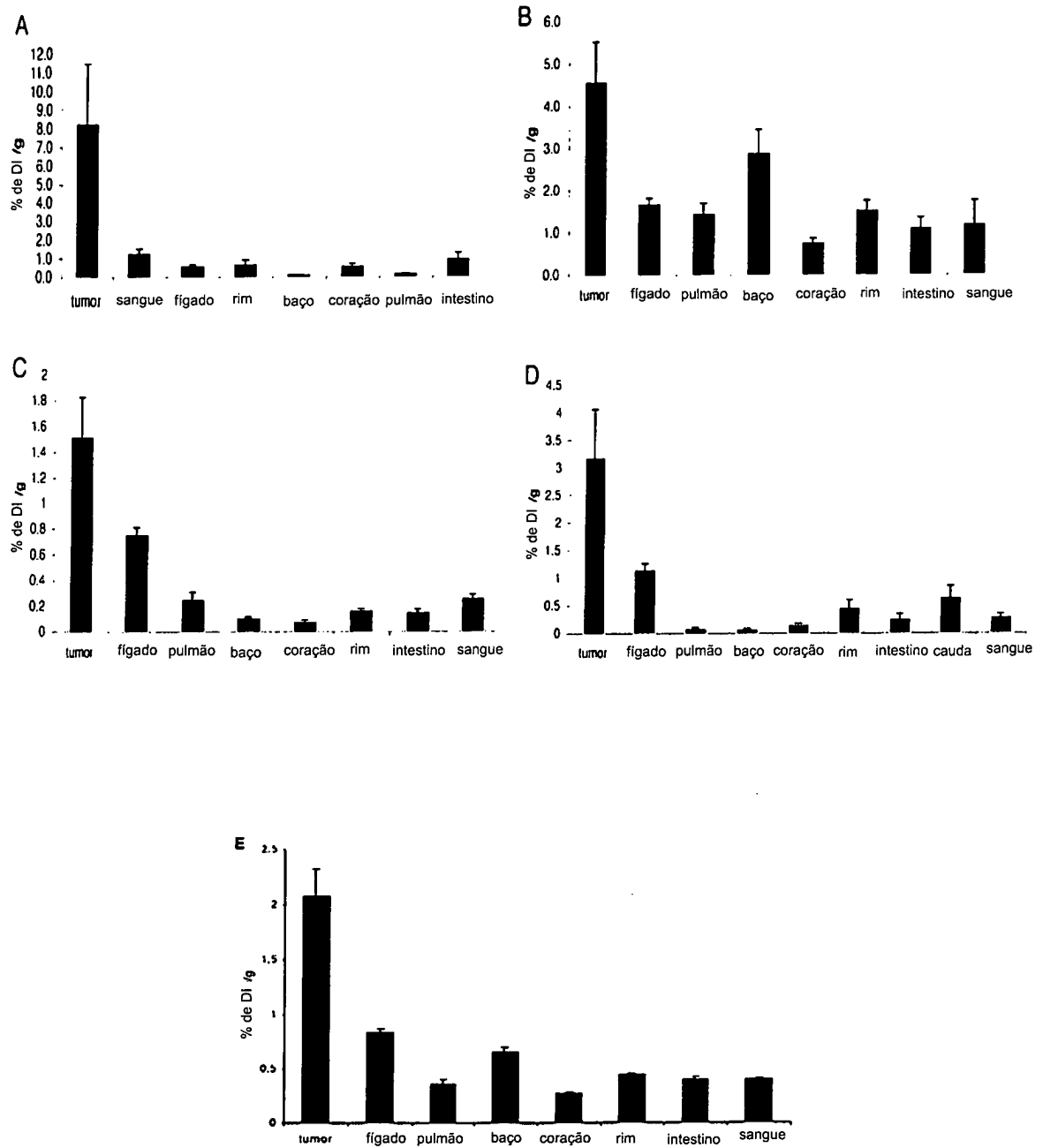


Fig. 2

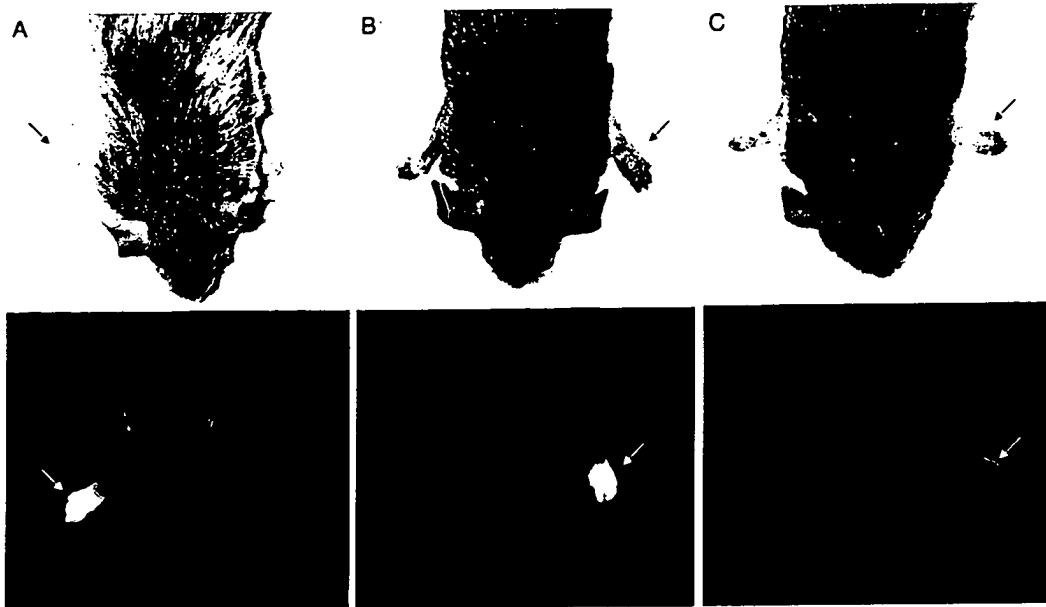


Fig. 3

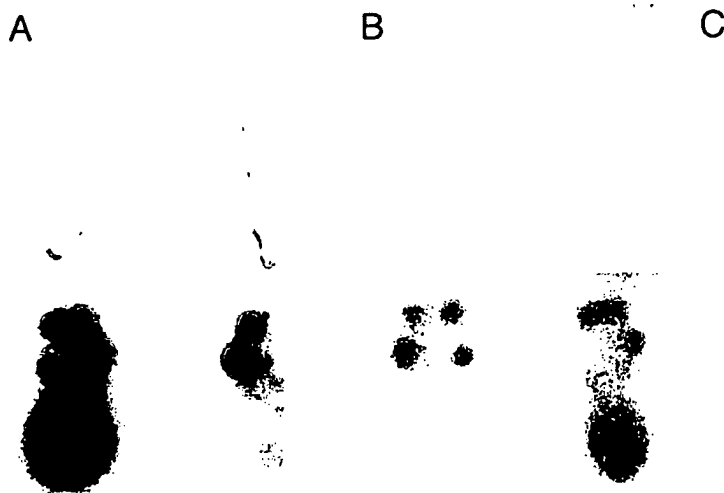


Fig. 4

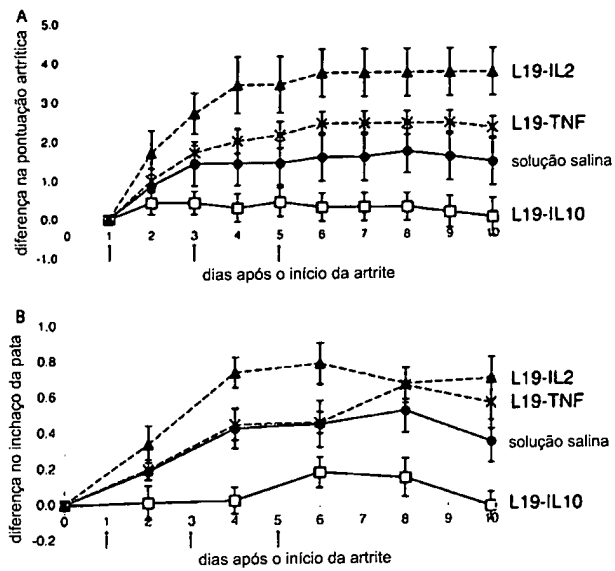


Fig. 5

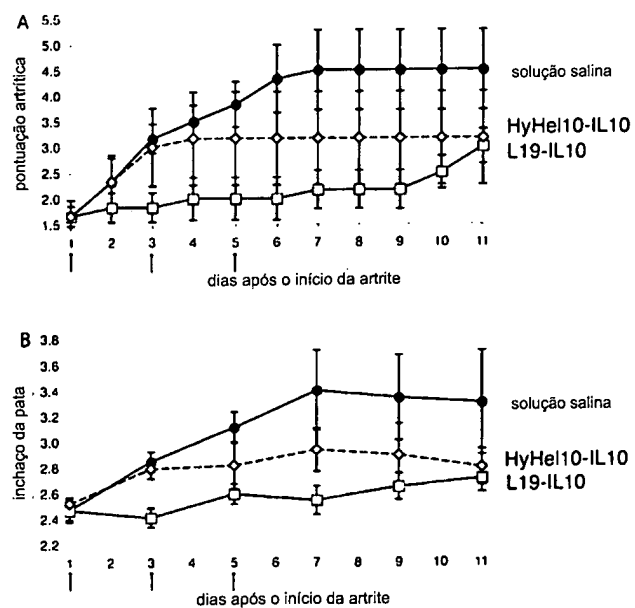


Fig. 6

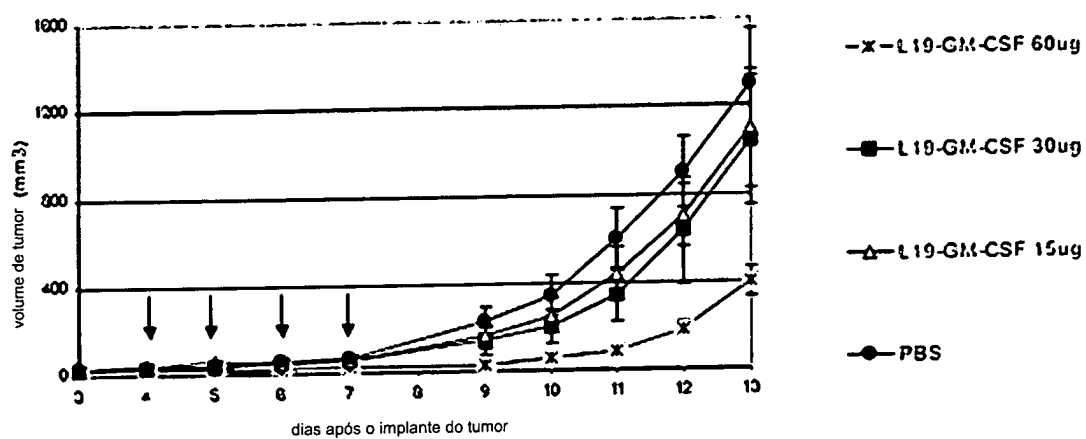


Fig. 7

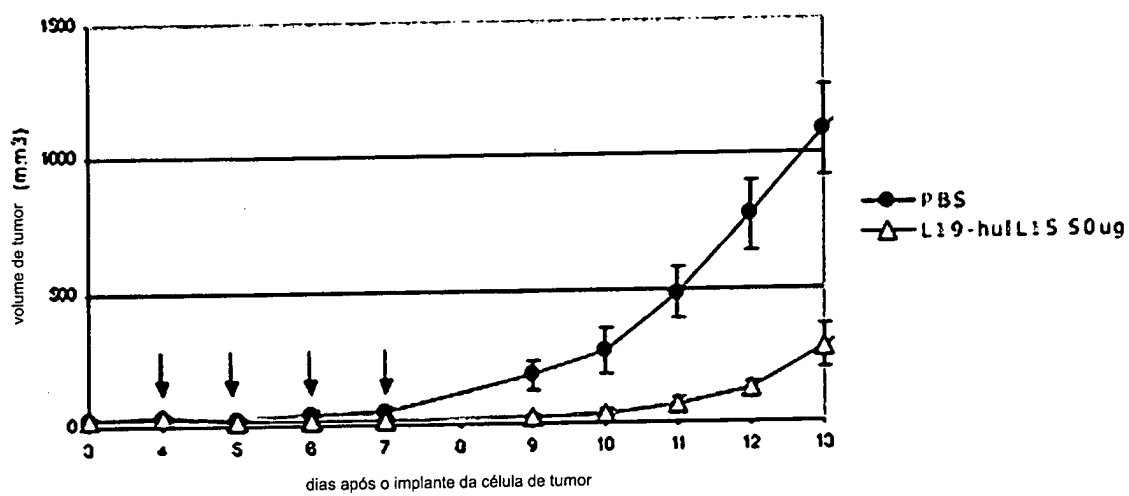
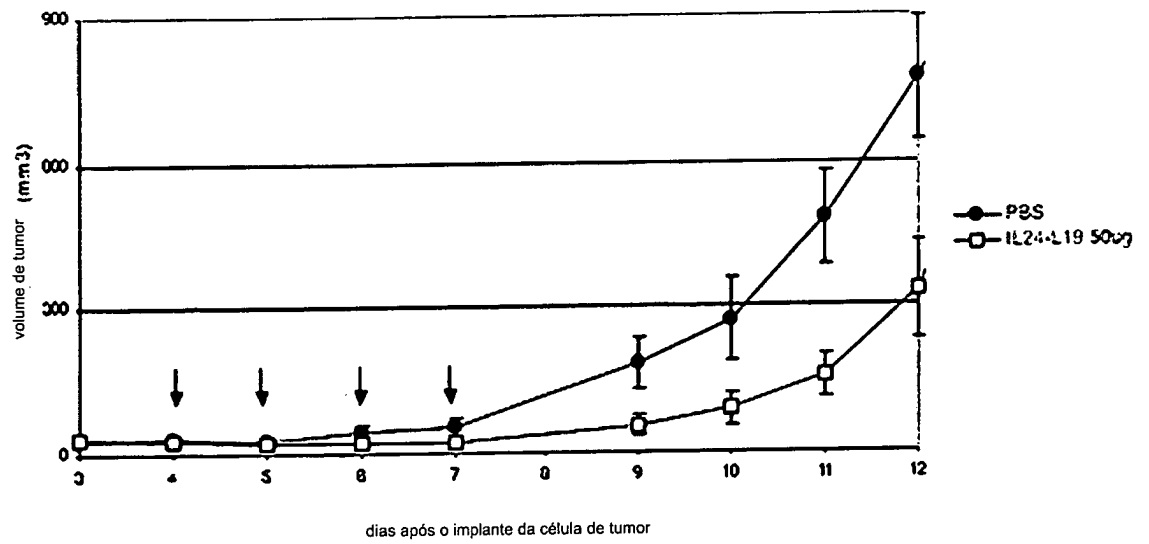


Fig.8



RESUMO

Patente de Invenção: **"CITOCINAS COM ANTICORPOS ALVEJADOS PARA TERAPIA"**.

5 A presente invenção refere-se às proteínas de fusão que compreendem um anticorpo, seu fragmento funcional ou derivado funcional tendo afinidade de ligação específica ao domínio extracelular da fibronectina oncofetal (ED-B) ou a pelo menos um dos domínios extracelulares da tenascina oncofetal, fundido a uma citocina selecionada a partir do grupo que consiste em IL-10, IL15, IL-24 e GM-CSF, fragmentos funcionais e derivados
10 funcionais do mesmos. A invenção também é dirigida ao uso de pelo menos uma das ditas proteínas de fusão para a fabricação de um medicamento. Em particular, a invenção diz respeito ao uso do dito medicamento para o tratamento de tumores ou doenças inflamatórias crônicas, tais como a aterosclerose, a artrite e a psoríase.