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

(21) **PI0613747-4 A2**

BRPI0613747A2

(22) Data de Depósito: 19/07/2006
(43) Data da Publicação: 08/02/2011
(RPI 2092)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/24
C07K 14/54
A61K 38/20
C07K 14/715

(54) Título: **POLIPEPTÍDEOS DE IL-7 GLICOSILADA, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E USOS**

(30) Prioridade Unionista: 20/07/2005 EP 052915568

(73) Titular(es): CYTHERIS

(72) Inventor(es): ANNE GREGOIRE, BRIGITTE ASSOULINE, CORINE BREQUE, IANN RANCE, MICHEL MORRE

(74) Procurador(es): ANTONELLA CARMINATTI

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006002663 de 19/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/010401de 25/01/2007

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEOS DE IL-7 GLICOSILADA, NETODOS DE PREPARAÇAO E USOS A presente invenção se refere a polipetídeos de interleucina-7, novos e melhorados, bem como de suas composições, suas preparações e seus usos. A invenção se refere, mais particularmente, a polipeptideos de IL-7 hiperglicosilada com propriedades melhoradas, bem como sua fabricação e seus usos terapêuticos. A invenção apresenta também novos polipeptídeos de IL-? com seqUências modificadas de aminoácidos, contendo sítios de glicosilação criados artificialmente, bem como moléculas de ácidos nucléicos, vetores e células hospedeiras recombinantes correspondentes. A invenção também se refere ao uso desses polipeptídeos, células ou ácidos nucléicos para tratamento curativo ou preventivo de mamíferos, incluindo seres humanos.

PI 0613747-4

POLIPEPTÍDEOS DE IL-7 GLICOSILADA, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E USOS

A presente invenção se refere a polipetídeos de interleucina-7, novos e melhorados, bem como de suas composições, suas preparações e seus usos. A invenção se refere, mais particularmente, a polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilada com propriedades melhoradas, sua fabricação e seus usos terapêuticos. A invenção divulga também novos polipeptídeos de IL-7 com seqüências modificadas de aminonoácidos, contendo sítios de glicosilação criados artificialmente, assim como as moléculas de ácidos nucléicos, vetores e células hospedeiras ou hospedeiras recombinantes correspondentes. A invenção também se refere ao uso desses polipeptídeos, células ou ácidos nucléicos para tratamento curativo ou preventivo de mamíferos, incluindo seres humanos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os linfócitos B e T são as células efetoras primárias da resposta imune. As duas classes de células são consideradas como derivadas, em última instância, de células-tronco hematopoéticas da medula óssea de mamíferos, via células progenitoras ou precursoras, que representam estágios distintos na diferenciação de cada classe. Células T maduras desenvolvem-se principalmente no timo, presumivelmente a partir de uma célula precursora, que migra da medula óssea para o timo em um estágio inicial do

desenvolvimento dos linfócitos T. O desenvolvimento de células linfóide depende de fatores de crescimento, sobrevivência e diferenciação produzidos por diversas células estromais. Vários fatores estão ativos nas células B e T periféricas maduras, incluindo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, gama interferon, BSF-2, neuroleucina, fator de crescimento beta transformador e IL-7.

Os termos interleucina-7 ou IL-7 se referem a uma glicoproteína secretada endogenamente em mamíferos, capaz de induzir a proliferação de precursores e progenitores de linfócitos derivados da medula óssea, incluindo os precursores especializados conhecidos como células pré-B. Derivada originalmente do elemento estromal de uma linhagem celular de medula óssea, a IL-7 é secretada também por células estromais do timo, do intestino e de outras células epiteliais, de algumas células dendríticas e dendríticas foliculares, de queratinócitos e de todos os tecidos linfóides em geral. Designações alternativas para essa molécula são "fator de crescimento de célula pré-B" e "linfopoietina-1".

As patentes EP0314415 (ou US4,965,195) descrevem proteínas interleucina-7 de mamíferos e seus correspondentes DNAs. A sequência de aminoácidos da IL-7 humana contém três sítios de glicosilação, supostamente N ligados, situados nos resíduos de Asn das posições 70, 91 e 116. A expressão recombinante transiente de hIL-7 (IL-7 humano) em células COS permitiu a visualização de r-huIL-7

(IL-7 humano recombinante) sob a forma de três bandas de proteína, de peso molecular aparente de cerca de 20, 24 e 28 kDa (Cosman et al.; Lymphokine Receptor Interactions; 1989; 179:229-236). A expressão recombinante estável de hIL-7 em células BHK também foi relatada (Armitage et al.; The Journal of Immunology; 1990; 144:938-941). Contudo, o grau de glicosilação da IL-7 humana natural, principalmente o de O-glicosilação, nunca foi documentado ou estudado. O impacto do perfil de glicosilação nas propriedades da IL-7 também nunca foi considerado. Além disso, IL-7 humana madura não-glicosilada (r-hIL-7), produzida em *E. coli*, como descrito na patente EP0314415, possui peso molecular de 17.387 Daltons e apresenta alta atividade *in vitro* em bio-ensaios específicos baseados na proliferação de diversas populações de linfócitos. Outras citocinas e fatores de crescimento como G-CSF, GM-CSF, IFN, HGF, etc, também apresentam atividade terapêutica plena sem glicosilação.

A patente WO2004/018681 apresenta um confôrmero ativo da IL-7 humana, contendo as pontes dissulfeto 1-4 (C2-C92), 2-5 (C34-C129) e 3-6 (C47-C141), os métodos de produzi-lo e caracterizá-lo, bem como seus usos.

A IL-7 foi descrita originalmente como uma citocina cuja principal atividade era induzir a proliferação de células do precursor B (Namen A.E. et al.; Journal of Experimental medicine; 1988; 167:988-1002). Mais recentemente, foi descrito o envolvimento da IL-7 na

sobrevivência e proliferação de timócitos (células T) durante os primeiros estágios do desenvolvimento dessas células (Schluns K.S. et al.; Nature Immunology; 2000; 1(5):426-432). O caminho da IL-7 é essencial para o desenvolvimento dos linfócitos, especialmente dos timócitos (Maeurer M.J. *et al.*, Int. Rev. Immunol. 1998, 16:309-22; Fry T.J. *et al.*, Blood 2002, 99:3892-904). Fry e colaboradores identificaram a IL-7 também como um potente modulador da regeneração de células T independentes, do timo, em uma ação multifatorial (Fry T.J. et al., Blood 2001, 97(6):1525-1533). A IL-7 modula fortemente as células T maduras e pode, ainda, influenciar o desenvolvimento de células apresentadoras de antígenos (Marquez C. *et al.*, J. Exp. Med. 1995, 181:475-83). A IL-7 é essencial para a regeneração das células T de memória, tanto na subpopulação CD4 quanto na CD8 (Kondrack R.M. *et al.*, J. Exp. Med. 2003, 198:1797-806; Kaech S.M. *et al.*, Nat. Immunol. 2003,; 4:1191-8).

A IL-7 tem, portanto, um enorme potencial terapêutico como estimulante da proliferação de precursores das células T, das células B secretoras de anticorpos, no estímulo da expansão das células T periféricas direcionadas por antígenos e na produção de células T selvagens, bem como de outros tipos de células hematopoiéticas. Uma aplicação terapêutica particularmente interessante das moléculas ativas de IL-7 é a reconstituição do sistema imunológico de pacientes linfopênicos, tais como aqueles que receberam tratamento contra o câncer, os que foram submetidos a

transplante de medula óssea ou de células-tronco, os que apresentam deficiência imunológica congênita ou adquirida, os idosos e quaisquer pacientes com contagem baixa de CD4. Outras utilizações derivam da capacidade que a IL-7 possui de produzir novas células T do tipo CD4 selvagem e de expandir aglomerados específicos, a fim de provocar ou aumentar respostas imunológicas específicas (*enhancer* de vacina).

Tendo em vista o seu potencial terapêutico, é de grande interesse desenvolver polipeptídeos de IL-7 ativos ou melhorados, adequados a um uso terapêutico eficiente. Com relação a isso, entre as várias citocinas e fatores de crescimento disponíveis no mercado, alguns são fracamente imunogênicos (por exemplo, o interferon alfa "IFNα" e o fator de crescimento de colônias de granulócitos "G-CSF"), de modo que as drogas correspondentes não necessitam que o polipeptídeo tenha um grau de pureza maior do que o usualmente aceito para as proteínas recombinantes. Por outro lado, outros fatores de crescimento são mais imunogênicos (por exemplo, o interferon beta "IFNβ" e o fator de estimulação de colônias de granulócitos macrófagos "GM-CSF") ou, então, sua atividade específica é tão fundamental para a vida (por exemplo, a eritropoietina, EPO) que o grau de pureza e o perfil da droga polipeptídica têm que ser determinados cuidadosamente e mantidos dentro de limites estreitos, a fim de protegê-la da imunogenicidade.

A IL-7 é uma molécula única. Devido a suas propriedades intrínsecas na ativação do sistema imunológico, ao ser utilizada como agente terapêutico ela é particularmente capaz de provocar uma ação imunogênica anti IL-7 (ligantes anti IL-7 ou anticorpos neutralizantes). Esse efeito imunogênico é prejudicial à atividade terapêutica da proteína a longo prazo. Os anticorpos anti IL-7 podem modificar a farmacocinética da IL-7, neutralizando sua ação terapêutica.

Diversas isoformas da IL-7 estão envolvidas nesse processo de produção de resposta imunológica anti IL-7. Entre eles incluem-se sequências modificadas de polipeptídeos (por exemplo, formas oxidadas, reduzidas, desaminadas ou truncadas) e multímeros covalentes, ou não-covalentes, de IL-7, como os seus agregados moleculares e assemelhados. Sendo assim, é fundamental determinar os polipeptídeos de IL-7 e as drogas derivadas mais estáveis e com menor probabilidade de formar agregados intermoleculares, bem como os que apresentem menor atividade imunogênica, porém conservando sua atividade biológica. De fato, enquanto a atividade da maioria das drogas está relacionada com o parâmetro AUC, a da IL-7 correlaciona-se com a meia-vida e, mais particularmente, com o tempo de residência médio.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção apresenta polipeptídeos novos e melhorados de IL-7, drogas e composições farmacêuticas derivados deles. Mais particularmente, a presente invenção apresenta novas espécies moleculares de IL-7 com alto grau de glicosilação e perfil de oligossacarídeos com maior peso molecular, em que os carboidratos apresentam grau de sialilação e fucosilação mais alto e ponto isoelétrico mais baixo. A presente invenção demonstra que esses novos perfis de oligossacarídeos confere às drogas que os contêm, maior estabilidade química e farmacêutica, além de um perfil farmacocinético mais prolongado após administração *in vivo*, caracterizado por um maior tempo de residência médio (TRM), que permite doses menos freqüentes.

Portanto, a presente invenção disponibiliza novos polipeptídeos de IL-7 altamente glicosilada ou hiperglicosilada, que possuem propriedades melhoradas. A invenção apresenta também novos polipeptídeos de IL-7 com seqüências modificadas de aminoácidos, contendo sítios de glicosilação criados artificialmente, bem como moléculas de ácidos nucléicos, vetores e células hospedeiras ou hospedeiras recombinantes correspondentes. A invenção também se refere ao uso desses polipeptídeos, células ou ácidos nucléicos para tratamento curativo ou preventivo de mamíferos, incluindo seres humanos. A presente invenção apresenta, portanto, novos polipeptídeos de IL-7 ativos, suas composições farmacêuticas e drogas derivadas, que apresentam maior estabilidade, menor susceptibilidade à proteólise e à agregação, maior atividade *in vivo* a longo

prazo e menor atividade imunogênica, o que permite gerar respostas imunes melhores, gerais ou específicas, em mamíferos.

Um objeto da presente invenção é uma composição contendo IL-7 hiperglicosilada.

Um outro objeto da presente invenção é um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada purificado, caracterizado por conter, pelo menos, três resíduos de aminoácidos N-glicosilados.

Um outro objeto da presente invenção é um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada, utilizado na preparação de um medicamento, que consiste desse polipeptídeo e um excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável, para tratamento de mamíferos.

Um outro objeto da presente invenção refere-se ao uso de uma composição de IL-7 hiperglicosilada para a preparação de um medicamento para tratamento de mamíferos.

Outro objeto da presente invenção é um método para provocar ou estimular a resposta imune de um indivíduo, caracterizado pela administração de uma quantidade efetiva da composição de IL-7 hiperglicosilada.

Outro objeto da presente invenção é um método para estimular a expansão de células T, *ex-vivo*, caracterizado

por colocar as células T em contato com um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada ou uma composição dele promovendo, assim, a expansão dessas células T.

Em uma modalidade específica da presente invenção, a composição de IL-7 hiperglicosilada é caracterizada por conter, pelo menos, 80%, preferencialmente entre 80 e 95%, de polipeptídeos de IL-7 glicosilada em, pelo menos, três resíduos de aminoácidos diferentes. Tais resíduos podem ser componentes naturais da seqüência polipeptídica de IL-7 e/ou sítios de glicosilação artificialmente criados.

Em outra modalidade específica da presente invenção, a composição de IL-7 hiperglicosilada é caracterizada por conter, pelo menos, 80%, preferencialmente entre 80 e 95% de polipeptídeos de IL-7 glicosilada em resíduos de aminoácidos diferentes, em número de três a oito, incluindo um sítio de O-glicosilação e até sete sítios de N-glicosilação. Tais resíduos podem ser componentes naturais da seqüência polipeptídica de IL-7 e/ou sítios de N-glicosilação artificialmente criados.

A esse respeito, outro objeto da presente invenção se refere a polipeptídeos de IL-7 contendo uma seqüência modificada de aminoácidos, a qual é caracterizada por conter, pelo menos, um sítio de glicosilação artificialmente criado. De acordo com modalidades específicas, os polipeptídeos de IL-7 da presente invenção contêm um, dois, três ou quatro sítios de glicosilação

artificialmente criados, preferencialmente um, dois ou três e, particularmente, um ou dois. Como será mostrado adiante, os sítios criados artificialmente são, de preferência, de N-glicosilação. Os polipeptídeos de IL-7 da presente invenção podem ser oriundos de qualquer mamífero, especialmente de origem humana. Além disso, esses polipeptídeos podem conter a sequência de um polipeptídeo de IL-7 maduro, ou ainda, possuir resíduos adicionais de aminoácidos como, por exemplo, de um peptídeo de secreção. Adicionalmente, ou como alternativa, o polipeptídeo de IL-7 deve ser um confôrmero específico contendo as seguintes três pontes dissulfeto: Cys: 1-4 (Cys2- Cys92); 2-5 (Cys34-Cys129); 3-6 (Cys47- Cys141). Exemplos específicos desses polipeptídeos de IL-7 modificados contêm, pelo menos, uma modificação de aminoácido, como mostrado na Tabela 1 abaixo, ou uma combinação delas.

Outro objeto da presente invenção consiste em uma molécula de ácido nucléico contendo um polipeptídeo de IL-7, como discutido acima. Essa molécula de ácido nucléico pode ser qualquer molécula de DNA ou RNA sendo, tipicamente, uma de cDNA.

Outro objeto da presente invenção consiste em uma molécula de ácido nucléico, que codifica um sinal de secreção contendo SEQ ID NO: 19.

Outro objeto da presente invenção consiste em um vetor, que contém uma molécula de ácido nucléico, como

definida acima. Esse vetor pode ser qualquer um procariótico ou eucariótico sendo, tipicamente, um vetor eucariótico; ele pode ser selecionado a partir de um plasmídeo, de DNA episssomal, de cosmídeo, de vetor viral, de cromossomo artificial, etc. Tal vetor pode conter qualquer sequência regulatória, que permita a expressão adequada do ácido nucléico codificado em uma célula hospedeira selecionada. Por exemplo, um promotor, um terminador, um poli A, uma origem de replicação, um intron, regiões 5' ou 3' não-traduzidas de genes (UTR), etc.

Os ácidos nucléicos e vetores acima podem ser usados, por exemplo, para produzir polipeptídeos de IL-7 recombinante de mamíferos em diversas células hospedeiras competentes, bem como para fins de terapia genética.

Outro objeto da presente invenção consiste em uma célula hospedeira recombinante contendo um ácido nucléico ou um vetor como apresentados acima. Essa célula recombinante pode ser procarionte ou, preferencialmente, eucarionte tal como uma célula de levedura, de inseto, de planta ou de mamífero; de preferência, deve ser uma célula hospedeira recombinante transduzida para expressar ou superexpressar uma glicosiltransferase e/ou uma sialiltransferase, por exemplo, uma de origem humana.

Outro objeto da presente invenção consiste em uma droga, que contém um polipeptídeo de IL-7 como descrito acima sendo, tipicamente, um polipeptídeo de IL-7

hiperglicosilada. Preferencialmente, a droga contém menos de 10% de polipeptídeo mono-glicosilado ou não-glicosilado de IL-7 e/ou é, essencialmente, livre de impurezas relacionadas ao produtos.

A presente invenção também se refere ao uso de uma droga como a descrita acima para fabricação de um medicamento (produto da droga) ou de uma composição farmacêutica.

A presente invenção se refere, ainda, a uma composição farmacêutica caracterizada por conter uma quantidade efetiva de polipeptídeo de IL-7 ou uma composição, ou uma droga, como descritos acima e um, ou mais, veículos ou excipientes farmaceuticamente compatíveis.

A invenção também se refere a um anticorpo, bem como fragmentos ou derivados dele, especificamente imunorreativo a um polipeptídeo de IL-7, como descrito acima; a linhagens celulares de hibridoma, que produzem tal anticorpo, e a composições utilizáveis em diagnóstico, análise ou terapia, que contenham o anticorpo, fragmentos ou derivados dele.

Outro aspecto da presente invenção é um método para produção de um polipeptídeo de IL-7 como descrito acima, a partir de células hospedeiras procariontes ou eucariontes, bem como um método para detecção ou medida da presença de tal polipeptídeo em uma amostra, ou para caracterização dessa amostra.

Em uma modalidade específica, o método para produção de um polipeptídeo de IL-7 como definido acima compreende:

a) cultivo de uma célula hospedeira recombinante como definida acima; e

b) isolamento do polipeptídeo de IL-7 produzido por esta célula.

De acordo com uma modalidade da presente invenção, a expressão ocorre sob condições que permitam adicionar motivos de glicosilação eficientes ao polipeptídeo de IL-7, em particular, resíduos de ácido siálico.

Em outra modalidade da presente invenção, a produção é feita em modo de alimentação por batelada ou por perfusão, mantendo-se as células no final da fase de crescimento exponencial. Essas condições aumentam a qualidade das modificações pós-translacionais e contribuem para um maior grau de sialilação por polipeptídeo de IL-7. De acordo com modalidades específicas da presente invenção, o ácido nucléico codificador contém um sinal de secreção e/ou uma sequência otimizada de ácidos nucléicos e/ou a célula hospedeira é eucarionte (por exemplo, uma célula de mamífero, de insetos ou de levedura).

Outro objeto da presente invenção se refere ao uso de um polipeptídeo de IL-7 ou uma composição de IL-7

hiperglicosilada, como definidos acima ou obtidos por um método descrito acima, para a fabricação de uma composição farmacêutica capaz de provocar ou de modular uma resposta imune em um indivíduo, especialmente, de induzir estimulação prolongada da linfopoiese e/ou de amplificar uma resposta imune.

A presente invenção se refere também ao uso de um polipeptídeo de IL-7 como definido acima ou obtido por um método descrito acima, para a fabricação de uma composição farmacêutica, que previna ou trate doenças associadas à imunodeficiência.

Como será discutido adiante, os polipeptídeos da presente invenção apresentam meia-vida plasmática e tempo de residência médio estendidos, o que favorece a atividade e a interação com o receptor *in vivo*; também apresentam maior estabilidade e menor ação imunogênica a longo prazo permitindo, assim, seu uso no tratamento de diversas patologias em mamíferos, especialmente em seres humanos.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Plasmídeo ph-pgk.EP7-hIL-7: ef1a pA: sequência "fator de alongamento 1 alfa" poli A; hgh pA: sequência "hormônio de crescimento humano" poli A; SpA: sequência poli A sintética; hph: resistência à higromicina; Amp: resistência à ampicilina; MAR βglobina de coelho: provável "Região Matriz de Ligação" de βglobina de coelho;

pr. tk: promotor de timidinaquinase; sv40 enh.: *enhancer* de sv40; pr pgk: promotor de fosfogliceratoquinase; 5'UTRint1: região 5' não-traduzida contendo um intron quimérico (hβ-globina-imunoglobulina); EP7-hIL7:*upstream* de IL-7 cDNA humano otimizado a partir do peptídeo-sinal EP7.

Figura 2: Plasmídeo pBh-pgk.EP7-hIL-7 : Bcl2: Bcl2 cDNA ; IRES: Sítio interno de Entrada de Ribossoma

Figura 3: Expressão de hIL-7 recombinante em células de mamíferos cultivadas em biorreator desde o dia 1 (D1) até o dia 10 (D10). Western blot de IL-7 intracelular *versus* secretado.

Figura 4: Fracionamento cromatográfico de glicoformas de rec-hIL-7 ao longo do processo de purificação: Análise SDS PAGE do conteúdo protéico em diferentes frações eluídas (B1- B10). As glicoformas de IL-7 foram separadas durante as etapas de captura e de HIC. Gradientes de tampão foram usadas de modo a eluir diferencialmente as glicoformas de hIL-7, de acordo com pequenas diferenças em suas propriedades físico-químicas. O fracionamento e subseqüente seleção das frações adequadas permitiu o enriquecimento no hIL-7 recombinante triplamente glicosilado (3N- ou 2N-associado com 1O-resíduo de açúcar). MPM, marcadores de peso molecular de proteínas (10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 37 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 ; 250kDa); B1-B10, frações eluídas; B1-B4, frações eluídas, separadas para purificação adicional; CT,

fração B1 obtida de uma cultura de linhagem celular HEK293 transfectada com o mesmo hIL-7 cDNA otimizado.

Figura 5: Análise, em SDS PAGE, do hIL-7 recombinante purificado. Amostras de hIL-7 recombinante purificado foram submetidas a SDS PAGE sob condições redutoras. Os géis foram revelados por:

A. Corante Coomassie

B. Western blot

MPM: marcadores de peso molecular (10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 37 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 ; 250kDa). Linha 1: HG-37-147 ; Linha 2: HG-40-104 ; Linha 3: HG-hIL-7 ; Linha 4: hIL-7 de *E. coli*.

Figura 6: Comparativo de peso molecular aparente, obtido por SDS-PAGE, de produtos de rec-hIL-7 glicosilada, purificados.

Linha M = Marcador de peso molecular; Linha 1 = representação esquemática do produto purificado como descrito por Namen *et al.* na patente US 5 328 988 (cerca de 25 KDa); Linha 2 = produto CHO rec-sIL-7 purificado pelo Requerente; Linha 3 = produto CHO rec-hIL-7 purificado pelo Requerente; Linha 4 = glicoformas 1N- e 2N-hIL-7, usadas como padrões para efeito de comparação dos pesos moleculares aparentes; Linha 5 = produto rec-hIL-7 de *E.coli* purificado pelo Requerente (CYT 99 007).

Figura 7: Análise de IL-7 recombinante humano purificado, por SDS PAGE sob condições redutoras, após desglicosilação.

As amostras de IL-7 recombinante humano, purificadas, foram digeridas por PNGase F : Amostras recolhidas de estudo cinético, de 2 minutos a 24 horas, foram aplicadas no gel.

Outra amostra (OO/N) foi digerida durante 24h com PNGase F + O-glicosidase/β(1-4)galactosidase/neuraminidase/N-Acetilglicosaminidase.

Amostras de IL-7 humana glicosilada e de IL-7 humana derivadas de *E. coli* também foram aplicadas no gel, como controle.

As glicoformas 3N+1O, 2N+1O, 1N+1O, 1O e a forma desglicosilada de IL-7 humana foram, então, separadas, de acordo com seu PM estimado no gel, respectivamente, 33, 27, 24, 18 e 17 kDa.

Figura 8: Análise por espectrometria de massas de diferentes glicoformas purificadas de rec-hIL-7.

- 23 kDa (23179 Da): Rec-hIL-7(CHO S,2N+3N)
- 25 kDa (25127 Da): Rec-hIL-7(CHO S,3N)

Figura 9: Análise por eletroforese 2D do polipeptídeo de IL-7 recombinante humana hiperglicosilada, purificado. Após focalização isoelétrica (pH entre 3 e 10), as glicoformas foram separadas por SDS PAGE sob condições redutoras (corante azul Coomassie).

Figura 10: Análise por espectrometria de massas de complexo recombinante de hIL-7 N-glucana. Amostras purificadas de hIL-7 glicosilada foram digeridas enzimaticamente com uma endoglucosidase, como a peptídeo-N-glucosidase F (PNGaseF, Roche). Os oligossacarídeos N-ligados e amostras de proteínas liberados pela digestão enzimática foram separados da estrutura peptídica e analisados por espectrometria de massas usando a técnica MALDI-TOF. Os valores de m/z correspondentes a cada pico foram comparados com bancos de dados internacionais, o que permitiu uma identificação precisa das N-glicanas presentes na molécula de hIL-7.

Figura 11: Caracterização das O-glicanas presentes no hIL-7 recombinante, por meio do uso de lecitinas específicas (blot de lecitina). Após separação das amostras de proteínas e blot em membrana, os produtos foram revelados com uma das duas lecitinas seguintes: MAA, de *Maackia amurensis* e PNA, de *Arachis hypogea*). Linha 1: padrão de fetuína, uma proteína sialilada; Linha 2: fetuína tratada com uma sialidase; Linha 3: hIL-7; Linha 4: hIL-7 tratada com sialidase.

Figura 12: Afinidade do peptídeo de IL-7 hiperglicosilada por lecitina (teste ELISA). Placas contendo lecitinas (LEA de *Lycopersicon esculentum*, WGA de *Triticum vulgare*, UEA.I de *Ulex europeus*, MAA de *Maackia amurensis*, ACA de *Amaranthus caudatus*, AIA de *Artocarpus intergrifolia*, ABA de *Agaricus bisporus*, PHA.L de *Phaseolus vulgaris*), usadas para ligar quantidades idênticas de preparações de hIL-7 recombinante purificada. Amostras de IL-7 ligada, dependendo da especificidade da lecitina frente à porção glicana, foram reveladas por meio de um anticorpo anti hIL-7 específico (Ab) combinado com biotina. O "sanduíche" de lecitina-IL-7-Ab foi revelado por um complexo de streptavidina-peroxidase.

Figura 13: Bio-ensaio de atividade da IL-7 recombinante humana. Cinética de dose-resposta do crescimento de células PB-1 induzido por r-hIL-7 não-glicosilada (expressada em *E. coli*) ou por r-hIL-7 altamente glicosilada (produzida em células de mamíferos).

Figura 14: Bio-ensaio de atividade da IL-7 recombinante humana. Dados cinéticos de dose-resposta e curvas obtidas como rotina em um bio-ensaio típico: o crescimento de células PB-1 foi induzido por r-hIL-7 não glicosilada (expressada em *E. coli*), altamente glicosilada ou hiperglicosilada (produzida em células de mamíferos). Os pontos representam a média ± SD de determinações em triplicata.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a composições de IL-7 hiperglicosilada, sua fabricação e suas aplicações na indústria farmacêutica. A presente invenção demonstra, pela primeira vez, que a atividade e/ou as propriedades da IL-7 podem ser melhoradas, dependendo do perfil de glicosilação do polipeptídeo. A presente invenção mostra também, surpreendentemente e ao contrário dos dados obtidos *in vitro,* que a melhor atividade *in vivo* pode ser obtida com polipeptíedos de IL-7 que contenham, pelo menos dois ou, preferencialmente, três sítios de N-glicosilação ocupados e um sítio de O-glicosilação, além de máxima sialilação terminal das porções de oligossacarídeo. A presente invenção ainda se refere a polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilada criados artificialmente, que apresentam atividade prolongada (permitindo, assim, menor freqüência de administração), e/ou menor atividade imunogênica a longo prazo. Tendo em vista a utilidade da IL-7, esses polipeptídeos e suas composições representam moléculas ativas de grande valor e utilidade para uso na regulação da resposta imune, inclusive em seres humanos.

Um primeiro objeto da presente invenção, portanto, consiste em uma composição de IL-7 hiperglicosilada.

Um outro objeto da presente invenção se refere ao emprego da IL-7 hiperglicosilada para fabricação de um medicamento, que consiste dessa IL-7 hiperglicosilada e de,

pelo menos um excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável, para tratamento de mamíferos.

Outro objeto da presente invenção é um método para provocar ou estimular uma resposta imune em um indivíduo, método este caracterizado pela administração de uma quantidade efetiva da composição de IL-7 hiperglicosilada.

Um outro objeto da presente invenção refere-se ao uso de uma composição de IL-7 hiperglicosilada e, preferencialmente, altamente sialilada, para a fabricação de um medicamento, que provoque ou estimule uma resposta imune nos pacientes.

No contexto da presente invenção, um "polipeptídeo de IL-7" designa um polipeptídeo de IL-7 de mamíferos (por exemplo, seres humanos, símios, bovinos, eqüinos, felinos ou caninos). De preferência, o polipeptídeo de IL-7 deve ser de origem humana, especialmente para uso como medicamento ou como vacina. Como alternativa, especialmente para uso em primatas não-humanos ou em aplicações veterinárias, o polipeptídeo de IL-7 pode provir de qualquer outro mamífero como, por exemplo, um polipeptídeo de IL-7 de símios, ou um polipeptídeo canino.

Os polipeptídeos humanos de IL-7 preferidos na presente invenção são caracterizados por possuir uma sequência de aminoácidos como descrita nas patentes EP 314 415 ou WO2004/018681 A2, suas variantes naturais ou seus

homólogos. A sequência de IL-7 humana está disponível também em bancos genéticos. A proteína de tipo selvagem típica contém 152 aminoácidos e, opcionalmente, um resíduo adicional de metionina N-terminal (SEQ ID NO: 1). Suas variantes incluem, de preferência, variantes alélicas naturais resultantes de polimorfismo natural, incluindo SNPs, variantes excisadas, etc. Em uma modalidade específica da presente invenção, o termo peptídeo de IL-7 é usado para designar um polipeptídeo que contenha a sequência de SEQ ID NO: 1 ou suas variantes naturais.

Em outra modalidade da presente invenção, o polipeptídeo de IL-7 é de origem canina. A esse respeito, a invenção apresenta, pela primeira vez, a sequência de um polipeptídeo de IL-7 isolado, a qual representa mais um objeto dessa invenção. Em particular, a presente invenção se refere a um polipeptídeo de IL-7, caracterizado por conter a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 7, bem como suas variantes naturais, homólogos ou fragmentos distintivos delas. Os termos "variantes" ou "homólogos" se referem a polipeptídeos que difiram da SEQ ID NO: 7 por remoção, substituição ou adição de um, ou de um número limitado de aminoácidos. De preferência, essas variantes ou homólogos apresentam um percentual de identidade com SEQ ID NO: 7 superior a 85%, especialmente, maior que 90%, particularmente, superior a 95% e, mais particularmente, superior a 98%.

O polipeptídeo de IL-7 usado na presente invenção é, de preferência, uma IL-7 recombinante. O termo "recombinante", como utilizado aqui, significa que o polipeptídeo seja obtido ou derivado de um sistema de expressão recombinante, ou seja, de uma cultura de células hospedeiras (por exemplo, microbiano, ou de inseto, ou de planta, ou de mamífero), ou de plantas ou de animais transgênicos produzidos para conter uma molécula de ácido nucléico que codifique um polipeptídeo de IL-7. O termo "microbiano" se refere a proteínas recombinantes produzidas por sistemas de expressão de bactérias O termo "mamíferos" se refere a glicoproteínas recombinantes produzidas por sistemas de expressão de mamíferos. Como será discutido adiante, todas essas células hospedeiras devem expressar de preferência, naturalmente ou após transgênese, um gene apropriado de glicosiltransferase e/ou sialiltransferase. O polipeptídeo de IL-7 pode, também, ser glicosilado pela ação, *in vitro* ou *in vivo*, da glicosiltransferase e/ou sialiltransferase apropriadas, ou pela incorporação de estruturas de oligossacarídeos.

Um exemplo específico de polipeptídeo de IL-7 humano é um polipeptídeo da SEQ ID NO: 1 contendo as pontes dissulfeto Cys2-Cys92; Cys34-Cys129 e Cys47-Cys141.

Os polipeptídeos de IL-7 da presente invenção também podem conter a sequência de um polipeptídeo de IL-7 maduro ou, ainda, resíduos adicionais de aminoácidos como, por exemplo, um peptídeo secretado. Exemplos preferidos desses

peptídeos secretados incluem, entre outros, um peptídeo-sinal selecionado entre EPO, SEAP, IgGkappa, Lactotransferina/vitronectina, VIP/vitronectina e cistatina bis. As sequências desses peptídeos-sinais estão mostradas, respectivamente, nas SEQ ID NO 13 a 18. Em uma modalidade específica da presente invenção, o peptídeo-sinal é um híbrido, construído pelos inventores desta, entre sequências derivadas dos peptídeos-sinais EPO e IL-7. A sequência desse peptídeo-sinal, denominado EPy7 ou EP7, é apresentada na SEQ ID NO: 19 e representa um objeto particular da presente invenção.

No contexto da presente invenção, o termo "IL-7 hiperglicosilada" designa um polipeptídeo de IL-7 contendo, pelo menos, três sítios de glicosilação ocupados, ou seja, contendo pelo menos três resíduos de aminoácidos glicosilados.

Um "sítio de glicosilação" designa qualquer resíduo de aminoácido ou região de um polipeptídeo sujeito a glicosilação, ou seja, ligação à estrutura de um carboidrato. Tais sítios são, tipicamente, de N-glicosilação (ou seja, qualquer resíduo de aminoácido ou região de um polipeptídeo, que permita ligação de um carboidrato através de uma ligação com o átomo de N) e/ou sítios de O-glicosilação (ou seja, qualquer resíduo de aminoácido ou região de um polipeptídeo, que permita ligação de um carboidrato através de uma ligação com o átomo de O). Sequências de consenso para sítios de

glicosilação são conhecidas, *per se*, no estado da técnica. A título de ilustração, um sítio consensual de N-glicosilação possui, tipicamente, a seguinte estrutura: Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina. Como será mostrado adiante, tais sítios de glicosilação podem ser componentes naturais da seqüência polipeptídica de IL-7 e/ou serem adicionados ou criados artificialmente nessa sequência.

O termo "composição de IL-7 hiperglicosilada" designa uma composição de IL-7 em que, pelo menos 80% dos polipeptídeos de IL-7 têm, no mínimo, três sítios de glicosilação ocupados, ou seja, contem pelo menos três resíduos de aminoácidos glicosilados. De preferência, tal composição contém, pelo menos, 80% de polipeptídeos glicosilados em, no mínimo, três sítios de N-glicosilação e, opcionalmente, em um sítio de O-glicosilação. Essa composição é, de preferência, essencialmente desprovida de polipeptídeos de IL-7 não-glicosilados ou monoglicosilados e contém, no máximo 20% de polipeptídeos de IL-7 diglicosilados. Em uma modalidade preferida da presente invenção, uma composição de IL-7 hiperglicosilada designa uma composição de IL-7 em que, pelo menos, 90% dos polipeptídeos de IL-7 são glicosilados em três sítios de N-glicosilação e, opcionalmente, em um sítio de O-glicosilação. Essa composição é, de preferência, essencialmente desprovida de polipeptídeos de IL-7 não-glicosilados ou monoglicosilados e contém, no máximo 10% de

polipeptídeos de IL-7 bis-N-glicosilados com, ou sem, polipeptídeos de IL-7 mono-O-glicosilados.

A sequência primária de aminoácidos de IL-7 contém três supostos sítios de N-glicosilação, a saber, resíduos de asparagina (Asn) nas posições 70, 91 e 116 (com relação à sequência do tipo selvagem humano, veja SEQ ID NO: 1). Além disso, a presente invenção mostra que a sequência de IL-7 contém, também, um sítio de O-glicosilação, que é um resíduo de treonina (Thr) na posição 110. Em uma modalidade particular da presente invenção, o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada é um polipeptídeo de IL-7 contendo os três sítios de N-glicosilação acima, ocupados e associados, ou não, a um sítio de O-glicosilação também ocupado. Nessa mesma modalidade, a composição de IL-7 hiperglicosilada é uma composição na qual, pelo menos, 80% dos polipeptídeos de IL-7 são glicosilados nos sítios de N-glicosilação acima e, opcionalmente, também no sítio de O-glicosilação.

Em uma modalidade da presente invenção, um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada pode conter sítios de glicosilação criados ou adicionados artificialmente. Assim, um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada da presente invenção é um polipeptídeo de IL-7 contendo, pelo menos, três sítios de N-glicosilação e um de O-glicosilação ocupados, sendo esses sítios de ocorrência natural e/ou criados/adicionados artificialmente; uma composição de IL-7 hiperglicosilada é uma composição na qual pelo menos 80% dos polipeptídeos de IL-7 são glicosilados em, no mínimo,

quatro sítios de glicosilação de ocorrência natural e/ou adicionados/criados artificialmente.

A esse respeito, a presente invenção apresenta polipeptídeos de IL-7 contendo uma seqüência modificada de aminoácidos, a qual é caracterizada por possuir, pelo menos, um sítio de glicosilação artificialmente criado. De acordo com modalidades específicas, os polipeptídeos de IL-7 da presente invenção contêm um, dois, três ou quatro sítios de glicosilação artificialmente criados, preferencialmente um, dois ou três e, particularmente, um ou dois.

Os sítios criados artificialmente são, de preferência, de N-glicosilação. Um sítio consensual de N-glicosilação possui, tipicamente, a seguinte estrutura: Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina.

Os sítios de glicosilação podem ser criados ou adicionados quimicamente, a partir de oligonucleotídeos sintéticos ou utilizando técnicas diversas, incluindo métodos mutagênicos, em várias posições da sequência primária de aminoácidos de IL-7, e seguindo técnicas conhecidas, *per se*, no estado da técnica. Uma vez que o polipeptídeo de IL-7 modificada deve manter a capacidade de se ligar a um receptor de IL-7, os sítios de glicosilação são, preferencialmente, criados em regiões ou domínios da sequência de polipeptídeo de IL-7, que não alterem essa capacidade. De preferência, esses sítios são introduzidos

do lado de fora das hélices alfa do polipeptídeo e, particularmente, não devem ser introduzidos nas proximidades imediatas dos resíduos de glicina. De preferência, eles devem ser introduzidos na região mais flexível, evitando as regiões mais rígidas e mais importantes para a estrutura terciária do polipeptídeo. Preferencialmente, a criação do sítio de glicosilação não deve afetar qualquer resíduo de cistina envolvido em ponte dissulfeto (por exemplo, Cys 2, 34, 47, 92, 129 e 141), nem qualquer resíduo criticamente envolvido na interação do polipeptídeo de IL-7 com seu receptor cognato (por exemplo, Ser 19, Leu 23 and 77, Tyr 12, Val 15, Gln 22, Lys 81 e Glu 84); também não deve afetar qualquer resíduo conservado, envolvido na atividade do polipeptídeo (por exemplo, Arg 133, Gln 136, Glu 137, Lys 139 e 144, Thr 140 e Asn 143) . Os sítios de glicosilação são criados, tipicamente, por mutação, remoção ou adição de um, ou vários, resíduos de aminoácidos da sequência primária de um polipeptídeo de IL-7 de referência, a fim de criar um sítio de glicosilação consensual típico.

Em uma modalidade específica, a presente invenção se refere a polipeptídeos de IL-7 contendo a sequência de um polipeptídeo de IL-7 humano (ou de outro mamífero) com uma, ou várias, modificações de aminoácidos selecionadas entre Lys28Asn - Ile30Ser - Ile30Thr - Ile30Asn - Ser32Thr - Leu35Ser - Leu35Thr - Glu38Ser - Glu38Thr - Phe39Ser - Phe39Thr - Phe42Ser - Phe42Thr - Glu52Ser - Glu52Thr - Val82Asn - Glu84Thr - Glu84Ser - Lys97Asn - Arg99Thr -

Arg99Ser - Ala102Asn - Leu104Thr - Leu104Ser - Leu104Asn - Glu106Thr - Glu106Ser - Leu128Ser - Leu128Thr - Ile145Asn - Met147Thr - Met147Ser - Met147Asn - Thr149Ser (ou de posições correspondentes em polipeptídeos de IL-7 de outros mamíferos).

Exemplos específicos de polipeptídeos de IL-7 (humano) da presente invenção possuem as modificações nos aminoácidos mostradas na Tabela 1 abaixo.

TABELA 1

Análogo de polipeptídeo de IL-7	Mudanças nos aminoácidos
HG28a	Lys28Asn ; Ile30Ser
HG28b	Lys28Asn ; Ile30Thr
HG30	Ile30Asn; Ser32Thr
HG33a	Leu35Ser
HG33b	Leu35Thr
HG36a	Glu38Ser
HG36b	Glu38Thr
HG37a	Phe39Ser
HG37b	Phe39Thr
HG40a	Phe42Ser
HG40b	Phe42Thr
HG50a	Glu52Ser
HG50b	Glu52Thr
HG82a	Val82Asn; Glu84Ser
HG82b	Val82Asn; Glu84Thr

HG97a	Lys97Asn; Arg99Ser
HG97b	Lys97Asn; Arg99Thr
HG102a	Ala102Asn; Leu104Ser
HG102b	Ala102Asn; Leu104Thr
HG104a	Leu104Asn; Glu106Ser
HG104b	Leu104Asn; Glu106Thr
HG126a	Leu128Ser
HG126b	Leu128Thr
HG145a	Ile145Asn; Met147Ser
HG145b	Ile145Asn; Met147Thr
HG147	Met147Asn; Thr149Ser

As modificações acima nos aminoácidos geram sítios de N-glicosilação sem alterar, substancialmente, a afinidade de ligação do IL-7 criando, assim, polipeptídeos de IL-7 melhorados, de acordo com a presente invenção.

A expressão "sem alterar, substancialmente, a afinidade de ligação" significa que essa afinidade não é alterada, ou que ela pode ser reduzida sem que os efeitos *in vivo* resultantes da interação com o receptor sofram impacto. Quando quantificada *in vitro*, a afinidade de

ligação pode ser reduzida em menos de 50%, de preferência em menos de 40%, particularmente, em menos de 30%, especialmente, em menos de 20% e, preferencialmente, em menos de 5%.

Além disso, as modificações acima podem ser combinadas para criar diversos sítios adicionais de glicosilação em um polipeptídeo de IL-7 da presente invenção. A esse respeito, a invenção se refere a qualquer polipeptídeo de IL-7 biologicamente ativo, que contenha a sequência primária de interleucina-7 (humana ou de outro mamífero) modificada pela adição de, pelo menos, entre um e quatro sítios de glicosilação (N-ligados). Outra modalidade preferida da presente invenção é um polipeptídeo de IL-7 biologicamente ativo, contendo uma sequência primária de interleucina-7, que possua um ou dois sítios de glicosilação (N-ligados) adicionais.

Os polipeptídeos de IL-7 preferidos da presente invenção são biologicamente ativos, ou seja, são capazes de se ligar a um receptor de interleucina-7, apresentam atividade *in vitro* em um bio-ensaio específico e/ou possuem maior tempo de residência médio (TRM) *in vivo*.

As atividades do padrão não-glicosilado e da IL-7 hiperglicosilada foram comparadas por meio de um bio-ensaio do tipo dose-resposta, no qual um valor de ED50 corresponde a uma dose igual à metade da atividade máxima.

A hiperglicosilação, geralmente, leva a uma atividade menor no bio-ensaio, o que não se traduz em menor atividade *in vivo*. Na verdade, na presente situação, o perfil cinético estendido aumenta a atividade *in vivo*.

A despeito da ED50 não refletir a atividade do IL-7 *in vivo*, ela permite comparar diferentes amostras com o mesmo nível de glicosilação. Nesse estudo, valores típicos de ED50 para o padrão não-glicosilado variaram entre 0,5 e 2,0ng de IL-7/mL, enquanto os valores para o material hiperglicosilado variaram entre 1,5 e 3,5ng de IL-7 hiperglicosilada/mL.

Os polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilada da presente invenção apresentam maior estabilidade, maior meia-vida e maior tempo de residência médio, *in vivo*, em hospedeiros mamíferos. Os termos "maior estabilidade", "maior meia-vida" e "maior tempo de residência médio" devem ser entendidos em comparação com as formas não-glicosiladas. Preferencialmente, o aumento na meia-vida é de, pelo menos, 3x, especialmente, pelo menos, entre 5 e 20x. O tempo de residência médio (TRM) indica a média do tempo de residência de cada molécula de IL-7 no sangue dos pacientes, após a dose inicial. De preferência, o aumento no TRM deve ser de, pelo menos, cerca de 2x ou, mais particularmente, de pelo menos, cerca de 4 a 10x, em comparação com o TRM das formas não-glicosiladas.

Por exemplo, a meia-vida plasmática da forma hiperglicosilada ficou entre 30 e 40 horas, enquanto a da forma não-glicosilada é, geralmente, de 5 a 8 horas (quando as duas formas são administradas nas mesmas condições, ou seja, uma injeção subcutânea).O tempo de residência médio (TRM) ficou em torno de 40 horas, contra cerca de 10 horas para a forma não-glicosilada.

Deve ser entendido que esta invenção engloba também qualquer fragmento distintivo de um polipeptídeo de IL-7 da presente invenção, ou seja, qualquer fragmento que contenha uma das modificações de aminoácidos mostradas acima, bem como qualquer fragmento contendo um sítio de glicosilação criado artificialmente, como mostrado acima. Tais fragmentos contêm, tipicamente, pelo menos cinco resíduos de aminoácidos - geralmente, pelo menos, 8, 9, 10, 11, 12 ou 15 resíduos -, e podem conter até 20, 30, 40, 50 ou mais resíduos de aminoácidos consecutivos. Esses fragmentos podem ser usados como antagonistas ou como imunogenes, para gerar anticorpos específicos.

Embora as posições dos aminoácidos dadas acima se refiram à sequência de polipeptídeo de IL-7 humano, deve-se entender que a presente invenção engloba também polipeptídeos com sequências primárias de IL-7 de outros mamíferos, modificadas por mutações homólogas em sequências de mamíferos, baseadas em alinhamento de sequências contra a sequência humana.

Uma modalidade preferida da presente invenção se refere a novos polipeptídeos de IL-7 biologicamente ativos contendo uma, ou várias, modificações nos aminoácidos, selecionados do grupo de Phe39Ser - Phe39Thr- Phe42Ser - Phe42Thr - Leu104Asn - Glu106Thr - Glu106Ser - Leu128Ser - Leu128Thr - Met147Asn, uma combinação deles e/ou um fragmento distintivo deles.

Os polipeptídeos de IL-7 modificados preferidos na presente invenção são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2

Análogo de polipeptídeo de IL-7	Mudanças de aminoácidos
HG37a	Phe39Ser
HG37b	Phe39Thr
HG40a	Phe42Ser
HG40b	Phe42Thr
HG104a	Leu104Asn; Glu106Ser
HG104b	Leu104Asn; Glu106Thr
HG126a	Leu128Ser
HG126b	Leu128Thr
HG147	Met147Asn; Thr149Ser

Outro objeto particular da presente invenção é um peptídeo de IL-7 hiperglicosilada contendo uma sequência primária de aminoácidos como apresentada acima.

A estrutura e o número de unidades de oligossacarídeo ligadas a um certo sítio de glicosilação em um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada da presente invenção podem variar. Podem ser, por exemplo, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, manose, galactose, glicose, fucose, xilose, ácido glicurônico, ácido idurônico e/ou ácidos siálicos.

Preferencialmente, polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilada contêm (ou são enriquecidos em) cadeias de carboidratos ligadas a N- e/ou a O-, selecionadas de:

a) uma cadeia de açúcares típica de mamíferos, preferencialmente do tipo expresso por células CHO;

b) uma cadeia de açúcares contendo uma cadeia complexa de N-carboidrato (por exemplo, uma estrutura biantenária ou triantenária), preferencialmente contendo muitas moléculas de manose e acetilglicosamina, bem como muitos resíduos terminais de ácido siálico;

c) uma cadeia de açúcar contendo uma cadeia de O-carboidrato sem, e preferencialmente com, um resíduo terminal de ácido siálico;

d) uma cadeia de açúcar sialilada por alfa-2,6-sialiltransferase ou alfa-2,3-sialitransferase; e/ou

e) uma cadeia de açúcar sialilada apresentando entre 3 e 30 sialil-N-acetilgalactosamina, preferencialmente, entre 7 e 23.

Cadeias de carboidratos particularmente preferidas compreendem estruturas triantenárias ou biantenárias com sialilação terminal completa ou parcial. Outras cadeias de carboidratos preferidas compreendem estruturas triantenárias e tri- ou di-sialilação, e/ou uma estrutura diantenária com di-sialilação Exemplos desses carboidratos são apresentados na Tabela 4, incluindo os motivos de números 2420, 2623, 2785 e 3092.

De acordo com outra modalidade específica, o polipeptídeo de interleucina-7 hiperglicosilada da presente invenção possui ponto isoelétrico médio menor que 6,5 e peso molecular aparente médio, superior a 27kDa, entre 28kDa e 65kDa (teórico para um índice de 7N + 10 glicosilações), especialmente entre 28kDa e 35kDa (como mostrado para um índice de 3N + 10 glicosilações), determinado por eletroforese em gel (confirmado por Wester

blot), que pode ser modificado para 25kDa na análise por espectrometria de massas.

Em uma modalidade específica, o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada da presente invenção é produzido por um mutante de glicosilação de mamífero, que expressa, de modo estável, alfa-2,6-sialiltransferase e apresenta um déficit na atividade da CMP-Neu5Ac hidrolase, preferencialmente, um mutante de glicosilação CHO. Essas glicosilações incluem, tipicamente, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, manose, galactose, glicose, fucose, xilose, ácido glicurônico, ácido idurônico e/ou ácidos siálicos.

Em outra modalidade, o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada é produzido por tecnologia recombinante em uma célula hospedeira humana, que pode ser selecionada de linhagens celulares estromais ou epiteliais humanas, HEK-293 (rim embrionário humano), HER (retina embrionária humana), HEK (queratinócitos epidermais humanos), linhagens celulares do timo ou do córtex-epitelial humanos, medula óssea humana ou linhagens celulares estromais de medula óssea humana.

Os polipeptídeos de interleucina-7 hiperglicosilada da presente invenção apresentam as seguintes características:

a) possuem perfil de secreção e taxa de produção melhoradas em linhagens celulares produtivas recombinadas; e/ou

b) possuem alto grau de resíduos de ácido siálico por polipeptídeo de IL-7, levando à diminuição do ponto isoelétrico e maior tempo de residência médio; e/ou

c) são protegidos por agregação intermolecular; e/ou

d) são menos suscetíveis à proteólise; e/ou

e) contêm sítios antigênicos mascarados, refletindo menor tendência imunogênica, reduzida vulnerabilidade à captura APC (células apresentadoras de antígenos), processamento e apresentação através de uma molécula NHC II; e/ou

f) têm maior estabilidade química; e/ou

g) têm meia-vida biológica estendida *in vivo* (isoforma de IL-7 de ação prolongada), em comparação com o peptídeo original, não-glicosilado; e/ou

h) têm maior atividade farmacológica *in vivo*, comparada com a da proteína original não-glicosilada, principalmente devido ao melhor tempo de residência médio (TRM); e/ou

i) permitem esquema de doses menos freqüentes: reduzindo de três a quatro vezes para uma ou duas por semana ou, para produtos de ação prolongada, uma vez a cada quinzena; e/ou

j) apresentam melhor perfil farmacocinético (menor pico de concentração e melhor tempo de residência médio) e/ou

k) apresentam peso molecular médio acima de 25kDa (como determinado por espectrometria de massas), ou 27kDa (como determinado por SDS-PAGE), e ponto isoelétrico médio menor que 6,5.

Os polipeptídeos da presente invenção podem se apresentar sob a forma monomérica, ou associados, ou complexados com um dado composto de escolha. A esse respeito, em uma modalidade específica da presente invenção, o confôrmero de IL-7 está associado ao fator de crescimento de hepatócitos (HGF), sob a forma de heterodímero. Este pode ser obtido quimicamente por complexação, ou por tecnologia de recombinação (ou seja, fusão genética).

Em outra modalidade específica da presente invenção, o polipeptídeo de IL-7 está ligado, funcionalmente, à porção Fc de uma cadeia pesada de um IgG, tipicamente através da região flexível de um peptídeo. Essas moléculas de fusão têm, potencialmente, estabilidade e meia-vida maiores, *in*

vivo. O resíduo de IgG é, preferencialmente, um IgG1 ou IgG4 humano.

Em outra modalidade específica, o polipeptídeo de IL-7 está funcionalmente associado à albumina sérica humana (HSA) ou a uma porção dela, sob a forma de proteína de fusão. Essas moléculas de fusão têm, potencialmente, maior estabilidade e meia-vida prolongada, *in vivo*.

Outro objeto da presente invenção é uma composição contendo IL-7 hiperglicosilada com preferencialmente, pelo menos 80%, especialmente entre 80 e 95% de polipeptídeos de IL-7 glicosilados em, pelo menos três resíduos de aminoácidos distintos; estes podem ser aminoácidos naturalmente presentes na sequência de polipeptídeo de IL-7 (por exemplo, sítios consensuais de N- e O-ligação de carboidrato) e/ou serem sítios de glicosilação artificialmente criados, como discutido acima.

De acordo com modalidades específicas, a presente invenção se refere a composições de IL-7 hiperglicosilada contendo:

a) como componente principal (> 80%, especialmente mais de 90%, preferencialmente mais de 95%) interleucina-7 glicosilada nos três sítios consensuais de N-ligação de carboidratos (Asn 70/91/116) e com, ou sem, mais um glicosídeo no sítio de O-ligação de carboidrato (Thr 110). De

preferência, a composição terá como componente minoritário (<20%, preferencialmente menos de 10%) interleucina-7 glicosilada apenas nos dois sítios consensuais de N-ligação de carboidratos (associados, ou não, a um sítio de O-glicosilação) e/ou será essencialmente livre de proteína mono- ou não-glicosilada; ou

b) como componente principal (> 80%, especialmente mais de 90%, preferencialmente mais de 95%) um análogo da interleucina-7 biologicamente ativo, contendo a sequência primária de aminoácidos da IL-7 modificada a fim de introduzir um sítio de glicosilação adicional, glicosilado nos quatro sítios de N-ligação de carboidratos e, ainda, glicosilado ou não em um sítio de O-ligação de carboidrato (Thr 110). Essa composição contém, de preferência, um teor menor do mesmo análogo (<20%, preferencialmente menos de 10%) glicosilado apenas em três ou dois sítios de N-ligação de carboidratos (associados ou não a um sítio de carboidrato O-ligado) e/ou essencialmente livre de proteína mono- ou não-glicosilada; ou

c) como componente principal (> 80%, especialmente mais de 90%, preferencialmente mais de 95%) de um análogo da interleucina-7 biologicamente ativo, contendo a sequência primária de aminoácidos da

IL-7 modificada a fim de introduzir dois sítios de glicosilação adicionais, glicosilados nos cinco sítios de N-ligação de carboidratos e, ainda, glicosilados ou não em um sítio de O-ligação de carboidrato (Thr 110). Essa composição contém, de preferência, um teor menor do mesmo análogo (<20%, preferencialmente menos de 10%) glicosilado apenas em quatro, três ou dois sítios de N-ligação de carboidratos (associados ou não a um sítio de carboidrato O-ligado) e/ou essencialmente livre de proteína mono- ou não-glicosilada; ou

d) como componente principal (> 80%, especialmente mais de 90%, preferencialmente mais de 95%) de um análogo da interleucina-7 biologicamente ativo, contendo a sequência primária de aminoácidos da IL-7 modificada a fim de introduzir três sítios de glicosilação adicionais, glicosilados nos seis sítios de N-ligação de carboidratos e, ainda, glicosilados ou não em um sítio de O-ligação de carboidrato (Thr 110). Essa composição contém, de preferência, um teor menor do mesmo análogo (<20%, preferencialmente menos de 10%) glicosilado apenas em cinco, quatro, três ou dois sítios de N-ligação de carboidratos (associados ou não a um sítio de carboidrato O-ligado) e/ou essencialmente livre de proteína mono- ou não-glicosilada; ou

e) como componente principal (> 80%, especialmente mais de 90%, preferencialmente mais de 95%) de um análogo da interleucina-7 biologicamente ativo, contendo a sequência primária de aminoácidos da IL-7 modificada a fim de introduzir quatro sítios de glicosilação adicionais, glicosilados nos sete sítios de N-ligação de carboidratos e, ainda, glicosilados ou não em um sítio de O-ligação de carboidrato (Thr 110). Essa composição contém, de preferência, um teor menor do mesmo análogo (<20%, preferencialmente menos de 10%) glicosilado apenas em seis, cinco, quatro, três ou dois sítios de N-ligação de carboidratos (associados ou não a um sítio de carboidrato O-ligado) e/ou essencialmente livre de proteína mono- ou não-glicosilada.

A presente invenção se refere também a composições farmacêuticas contendo as composições acima como princípios ativos.

Outro objeto da presente invenção consiste de uma molécula de ácido nucléico, que codifica um polipeptídeo de IL-7, como discutido acima. Essa molécula de ácido nucléico pode ser qualquer molécula de DNA ou RNA sendo, tipicamente, uma de cDNA.

Um objeto específico dessa invenção é um ácido nucléico contendo resíduos nucleotídicos de 79 ao Final da SEQ ID NO: 2, seus fragmentos distintivos e sua fita complementar.

Outro objeto dessa invenção é um ácido nucléico contendo SEQ ID NO: 4, bem como qualquer de seus fragmentos distintivos, variantes (contendo, pelo menos 90% de identidade com SEQ ID NO: 4) e suas fitas complementares.

Outro objeto dessa invenção é um ácido nucléico contendo SEQ ID NO: 6, bem como qualquer de seus fragmentos distintivos, variantes (contendo, pelo menos 90% de identidade com SEQ ID NO: 6) e suas fitas complementares. Um objeto específico dessa invenção é um ácido nucléico contendo resíduos nucleotídicos de 79 ao Fim da SEQ ID NO: 6, bem como suas variantes (contendo, pelo menos 90% de identidade com SEQ ID NO: 6) e suas fitas complementares. A invenção também compreende um polipeptídeo, que codifica essas sequências (por exemplo, SEQ ID NO:7).

O termo "variante", como usado acima em relação ao ácido nucléico designa, mais especificamente, uma sequência de nucleotídeos que se hibridiza à sequência de referência, sob condições rigorosas e/ou codifica um polipeptídeo que possui o mesmo tipo de atividade do polipeptídeo codificado pela sequência de referência. As variantes preferidas têm, pelo menos, entre 92 e 99% (por exemplo, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade com a sequência de referência.

Outro objeto específico da presente invenção é um ácido nucléico contendo a seguinte sequência:

CTG AAT AAC GAA ACT AAC SEQ ID NO:8

AAC TTC ACT AAG SEQ ID NO:9

GCC AAC GGT ACC SEQ ID NO:10

CTG AAC GAC AGC TGT SEQ ID NO:11, ou

ATC TTG AAC GGG SEQ ID NO: 12, ou uma combinação delas.

Exemplos específicos de ácidos nucléicos da presente invenção incluem as sequências de nucleotídeos de quaisquer das SEQ ID NOs: 8 a 12.

Outro objeto da presente invenção consiste em um vetor de clonagem e/ou de expressão, que contém uma molécula de ácido nucléico, como definida acima. Esse vetor pode ser qualquer um, procarionte ou eucarionte sendo, tipicamente, um vetor eucarionte. Ele pode ser selecionado a partir de um plasmídeo, de um cosmídeo, de um vetor viral, de um cromossomo artificial, etc., e conter qualquer sequência regulatória, que permita a expressão adequada do ácido nucléico codificado em uma célula hospedeira selecionada; por exemplo, um promotor, um terminador, um poli A, uma origem de replicação, uma região de integração (por

exemplo, região homóloga), um intron, sequências UTR, um gene marcador, etc.

Um objeto específico da presente invenção é um vetor de expressão, contendo uma molécula de ácido nucléico como definida acima, incluindo um peptídeo-sinal ligado operacionalmente a elementos reguladores, permitindo a expressão desse ácido nucléico em mamíferos hospedeiros ou em células hospedeiras.

Elementos reguladores preferidos incluem um promotor, o qual pode ser selecionado entre promotores virais, celulares e sintéticos, incluindo os constitutivos, os tecido-específicos e os regulados, especialmente entre os do grupo que consiste em um promotor CMV, um E1Fa e um metalotioneína, sem se limitar a estes. Outros elementos reguladores, que podem estar contidos nos vetores da presente invenção incluem, sem se limitar a estes, um gene Bcl-2, sequências UTR e sequências MAR.

Em uma modalidade da presente invenção, o vetor é de expressão episssômica.

Os ácidos nucléicos e vetores acima podem ser usados, por exemplo, para produzir polipeptídeos de IL-7 recombinantes de mamíferos em diversos hospedeiros ou células hospedeiras competentes, bem como para fins de terapia genética.

Outro objeto da presente invenção consiste em uma célula hospedeira recombinante contendo um ácido nucléico ou um vetor como apresentados acima. Essa célula recombinante pode ser procariótica ou, preferencialmente, eucariótica como, por exemplo, célula de levedura, de inseto, de planta ou de mamífero.

Em uma modalidade preferida da prsente invenção, a célula hospedeira é de mamífero, selecionada de preferência, entre células de PERC6, NSO e BHK, especialmente, CHO, ou de linhagem celular humana. Os vetores, construtos e células recombinantes serão apresentados em mais detalhes em uma seção subsequente deste documento, mas não se limitam aos apresentados.

Outro objeto da presente invenção consiste em uma droga, que contém como produto-alvo, um polipeptídeo de IL-7 como descrito acima sendo, tipicamente, um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada. Preferencialmente, a droga contém menos de 10% de polipeptídeo de IL-7 mono-glicosilado ou não-glicosilado e/ou é, essencialmente, livre de impurezas relacionadas aos produtos.

A presente invenção também se refere ao uso de uma droga como a descrita acima para fabricação de um medicamento (produto da droga) ou de uma composição farmacêutica.

Uma droga deve ainda, de preferência, ser substancialmente livre de impurezas relacionadas com o processo.

No contexto da presente aplicação, o termo "droga" se refere a um produto adequado para ser utilizado como princípio ativo de um medicamento. A "droga", de acordo com a presente invenção é um produto complexo por natureza, ou seja, em decorrência do seu método de produção (por exemplo, tecnologia de DNA recombinante).

A presente invenção mostra que, para produzir efeito terapêutico e de *enhancer* de vacinas eficientes, uma droga ou composição farmacêutica de IL-7 deve conter como espécie molecular principal, uma composição de polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada.

O termo "substancialmente livre", como usado nesse documento, indica que a droga não contém quantidades significantes ou prejudiciais de impurezas relacionadas com o produto ou com o processo. Mais especificamente, a droga deve conter menos de 5%, especialmente menos de 3% e, preferencialmente, menos de 2% de impurezas relacionadas ao produto ou ao processo. As drogas preferidas contêm menos de cerca de 1% de impurezas relacionadas ao produto e apenas traços de impurezas relacionadas ao processo.

A expressão "substâncias relacionadas com o produto de IL-7" designa variantes moleculares de IL-7, que incluem,

por exemplo, peptídeos ativos ou inativos, ou fragmentos polipeptídicos de IL-7. Impurezas relacionadas com IL-7 incluem, por exemplo, polipeptídeos de IL-7 humano contendo pontes mono- ou dissulfeto, IL-7 truncado, IL-7 recombinante desaminado, IL-7 contendo proteínas diméricas ou multiméricas, forma oxidada de metionina, ou uma combinação destas.

Seja qual for sua atividade biológica, essas variantes moleculares e impurezas relacionadas a IL-7 devem ser rigidamente minimizadas ou eliminadas da droga.

Impurezas relacionadas ao processo incluem DNA, endotoxinas, debris celular, vírus, etc.

Assim, uma droga preferida é aquela em que a quantidade total, em peso, de uma composição de IL-7 hiperglicosilada contém, pelo menos, 95% em peso, particularmente pelo menos 98% em peso, especialmente pelo menos 99,5% em peso de uma composição de IL-7 hiperglicosilada de acordo com a invenção.

A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica contendo uma quantidade efetiva da droga ou da composição de IL-7 hiperglicosilada, como descritas acima, e um ou mais veículos, excipientes ou diluentes farmaceuticamente compatíveis ou aceitáveis.

A invenção mostra que composições farmacêuticas contendo uma composição de IL-7 hiperglicosilada como descrita acima aumenta, claramente, as propriedades da vacina de IL-7 e sua capacidade de estimular respostas imunes a antígenos específicos.

O veículo, excipiente ou diluente farmaceuticamente compatível ou fisiologicamente aceitável pode ser selecionado entre soluções ou suspensões neutras ou levemente ácidas, isotônicas, tamponadas e, preferencialmente, entre sacarose, trealose e aminoácidos. O veículo farmaceuticamente compatível deve, preferencialmente, estar em um tampão apropriado, de modo a formar uma solução isotônica. Um tampão apropriado deve, preferencialmente, ter uma faixa de pH entre 4,5 e 7,5, especialmente entre 5,0 e 7,0, particularmente em torno de 5,5 e ser, de preferência, um sal orgânico escolhido entre tampão de citrato de sódio ou de acetato de amônio. A composição farmacêutica pode apresentar-se sob a forma de suspensão, solução, gel, pó, sólido, etc. A composição deve, preferencialmente, ter a forma líquida.

A composição pode conter estabilizantes - como açúcares, aminoácidos e proteínas -, surfactantes, etc. Ela pode, também, conter qualquer solução salina, incluindo fosfatos, cloreto, etc.

Uma composição farmacêutica específica, de acordo com a presente invenção contém, além da droga ativa, uma

proteína e/ou um surfactante. A presença de uma proteína, ou de qualquer outra molécula natural de alto peso molecular, reduz a exposição da IL-7 ao sistema imue do hospedeiro evitando, assim, efeitos secundários. De preferência, a proteína deve ser não-imunogênica, tal como qualquer uma de origem humana. Um exemplo especialmente preferido de proteína é a albumina sérica humana. O surfactante pode ser selecionado entre os conhecidos, como os polissorbatos, de preferência Tween20™ ou Tween80™. Uma composição específica da presente invenção contém albumina sérica humana (de preferência entre 2 e 5mg/mL) ou polissorbato (Tween 20 or 80, tipicamente a 0,005%) ou qualquer outra substância, como um surfactante, ou um aminoácido (por exemplo, arginina, glutamato, ou mistura dos dois), ou um açúcar (por exemplo, sacarose, trealose, sorbitol) capaz de evitar a imunogenicidade de IL-7, devida à agregação protéica e/ou persistência local da droga no local da injeção, após administração da composição.

A esse respeito, objetos particulares da presente invenção são composições farmacêuticas contendo uma composição de interleucina-7 hiperglicosilada em concentração entre 1mg/mL e 50mg/mL, de preferência entre cerca de 3mg/mL e 20mg/mL. Preferencialmente, a quantidade efetiva de interleucina-7 glicosilada a ser administrada deve estar compreendida entre 10 e 200 µg/kg/semana, particularmente entre cerca de 10 e 60 µg/kg/semana para, por exemplo, tratamento ou prevenção de doenças infecciosas.

Em vista das melhores propriedades dos polipeptídeos e composições da presente invenção, as composições farmacêuticas precisam ser administradas com menos frequência que as composições ou produtos disponíveis anteriormente, em quantidade equivalente, para obtenção de efeitos terapêuticos comparáveis. Mais especificamente, em uma modalidade típica da presente invenção, as composições são administradas três vezes por semana, duas vezes por semana, uma vez por semana, uma vez em semanas alternadas, uma vez por mês, uma ou duas vezes antes da vacinação ou antes e após vacinação. Um regime de dose preferido consiste na administração da composição farmacêutica uma vez a cada 7, 10 ou 14 dias.

As vias de administração preferidas são as parenterais Entre elas, a preferida é a intratumoral, sendo particularmente preferida a administração intravenosa ou a subcutânea, incluindo também injeções intra-arteriais, intraperitoniais ou intramusculares. Deve-se entender, contudo, que qualquer outra via de administração adequada pode ser usada, dependendo do estado de saúde e da reação do paciente.

Em uma modalidade particular, a via de administração é a oral. Essa via é aceitável para a IL-7 hiperglicosilada devido à excepcional estabilidade dessa proteína em comparação com outros hormônios polipeptídicos. As composições da presente invenção são apresentadas, então,

na forma sólida (comprimido, pó ou cápsula), ou na forma líquida (como xarope ou emulsão), preparadas em um veículo apropriado e farmaceuticamente aceitável. De preferência, o veículo deve manter-se estável no trato gastro-intestinal e no sistema circulatório, além de possuir meia-vida plasmática aceitável. Cápsulas resistentes ao suco gástrico, tais como aquelas contendo o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada formulado como micro-emulsão ou em lipossoma são vantajosas.

A composição farmacêutica pode conter ingredientes ativos adicionais, tais como agentes imunoestimulantes, preferencialmente selecionados entre um fator de crescimento de célula hematopoiética, uma citoquina, uma molécula antigênica (ou antígeno) e um adjuvante, para uso combinado, separado ou seqüencial.

Tais ingredientes ativos adicionais podem ser formulados combinados com a IL-7, ou em separado, para uso combinado, separado ou seqüencial. Em uma primeira variação, os ingredientes ativos são formulados juntos, no mesmo recipiente ou vaso. Em outra, preferida, eles são acondicionados separadamente, ou seja, em recipientes ou vasos separados. De acordo com essa modalidade, os ingredientes podem ser administrados separadamente, por exemplo, simultânea ou sequencialmente (ou seja, injetados em lugares ou tempos diferentes), para produzir o efeito biológico mais eficiente. Também, como dito acima,

administrações repetidas de um ou dois ingredientes ativos podem ser feitas.

Com relação a isso, a invenção se refere a uma composição farmacêutica contendo uma composição de IL-7 hiperglicosilada como descrita acima e um ingrediente ativo selecionado entre um imunoestimulante e uma molécula antigênica, para uso combinado, separado ou seqüencial. De preferência, os adjuvantes devem ser preparados separadamente.

O fator de crescimento de células hematopoiéticas deve ser selecionado, preferencialmente, entre Fator de Células-Tronco (SCF), particularmente de sua forma solúvel, G-CSF, GM-CSF, ligante Flt-3, IL-15 e IL-2. Exemplos típicos de citoquinas ou quimioquinas usadas como *enhancer* de vacina incluem citoquinas indutoras e/ou estimuladoras de resposta imune do tipo Th1. A citoquina deve ser, preferencialmente, selecionada entre α ou γ interferon, IL-2, IL-12, RANTES, B7-1, MIP-2 e MIP-1α. Deve-se compreender que outros fatores, como ativadores de células NK e/ou NKT, FGF7 ou FGF10, interleucinas e/ou hormônios podem ser usados em combinação com IL-7 para fornecer benefício terapêutico adicional.

Uma composição específica da presente invenção contém uma composição de IL-7 hiperglicosilada como descrita acima e Fator de Célula-Tronco, particularmente sua forma solúvel, IL-15 e/ou ligante Flt-3 e/ou FGF10.

Outra composição específica dessa invenção contém uma composição de IL-7 hiperglicosilada como descrita acima e uma citoquina, selecionada entre α ou γ interferon, IL-2, IL-12, RANTES e MIP-1α.

Outra composição específica dessa invenção contém uma composição de IL-7 hiperglicosilada como descrita acima, um Fator de Célula-Tronco e uma citoquina.

Como indicado acima, a composição farmacêutica pode conter, ainda, um ou mais antígenos (ou moléculas antigênicas), para uso combinado, separado ou seqüencial. O antígeno pode ser qualquer peptídeo natural ou sintético, uma proteína recombinante, um produto de patógeno morto, inativado ou atenuado, um microorganismo, um parasita, um lipídeo, etc., uma porção e uma combinação deles. O antígeno pode ser uma proteína integral, ou qualquer fragmento ou porção de proteína contendo epítopo, especialmente peptídeos presentes no sistema imune através de moléculas das classes MHC I ou II. Pode-se utilizar qualquer antígeno viral, bacteriano, parasitário, tumoral, etc. Exemplos específicos de antígenos incluem aqueles derivados de HIV, Varicella Zoster, Influenza, Epstein Barr, Herpes Simplex tipo I ou II, citomegalovírus humano, vírus da dengue, da hepatite A, B, C, D ou E, vírus *Syncytium* respiratório, papilomavírus humano, *mycobacterium tuberculosis*, Toxoplasma e Chlamydia.

Um objeto particular da presente invenção se refere a uma composição contendo uma composição de IL-7 hiperglicosilada como descrita acima e uma molécula antigênica, para uso combinado, separado ou seqüencial. A composição pode conter, ainda, um ou mais agentes imunoestimuladores como apresentado acima, para uso combinado, separado ou seqüencial.

Outro objeto particular da presente invenção se refere a uma composição farmacêutica contendo uma composição de IL-7 hiperglicosilada como descrita acima, onde a composição farmacêutica é administrada simultaneamente, poucos dias antes ou sequencialmente com uma ou mais moléculas antigênicas, a fim de obter e/ou estimular uma resposta imunológica antígeno-específica, no paciente.

Outro objeto particular da presente invenção se refere a um método que provoque ou intensifique a resposta imunológica antígeno-específica em pacientes. Método este, que consiste na administração desse antígeno (ou de um fragmento dele contendo epítopo) e uma composição de IL-7 hiperglicosilada, como descrito acima. A composição pode ser administrada simultaneamente, poucos dias antes ou em sequência com o antígeno, preferencialmente antes dele, a fim de obter ou estimular uma resposta imunológica antígeno-específica no paciente.

Em outra modalidade preferida, a composição da presente invenção contém um adjuvante. Este pode ser

selecionado de qualquer substância, mistura, soluto ou composição que facilite ou aumente a imunogenicidade do antígeno e consiga induzir uma resposta imune do tipo Th1, como CpG, QS21, ISCOM e monofosforil lípide A. Tais adjuvantes são especialmente adequados para produção e/ou amplificação de resposta imune antígeno-específica, em mamíferos, de modo especial em seres humanos. O adjuvante deve, preferencialmente, ser acondicionado e administrado separadamente da composição que contém a IL-7 e/ou em um local de injeção diferente, de preferência junto com o(s) antígeno(s) desejado(s).

A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica contendo uma quantidade efetiva de uma composição de IL-7 humana hiperglicosilada, de acordo com a presente invenção, misturada com um diluente, excipiente ou veículo adequado para administração parenteral a pacientes humanos, para estimulação profilática ou terapêutica do desenvolvimento e proliferação de linfócitos B ou T, ou ainda, para intensificação de uma resposta imune. As composições farmacêuticas da presente invenção induzem estimulação prolongada da linfopoiese e/ou respostas imunes ampliadas.

Uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção também pode ser utilizada em seres humanos, para estimulação profilática ou terapêutica do desenvolvimento e proliferação de linfócitos B ou T, para incremento da

imuno-reconstituição global e/ou específica, ou ainda, para aumento das respostas imunes humorais e/ou celulares.

Uma composição farmacêutica particular, de acordo com a presente invenção, tem aplicação na inibição ou redução de infecções oportunistas em pacientes imunodeficientes.

Outra composição farmacêutica particular, de acordo com a presente invenção, aplica-se no prolongamento da estimulação de linfopoiese e/ou na produção de resposta imune específica, não somente contra epítopos dominantes, mas também contra os subdominantes ou epítopos menos imunogênicos, que possuem menor afinidade pelo receptor de células T; isso permite ampliar o repertório de respostas imuno-específicas em seres humanos.

A presente invenção é particularmente adequada para produzir uma resposta imune preventiva ou curativa, em indivíduos tais como os imunodeficientes, cancerosos, transplantados, infectados por vírus ou parasitas, idosos ou quaisquer outros pacientes com contagem reduzida de CD4, etc.

Usos específicos e preferidos dos polipeptídeos de IL-7 e composições dessa invenção incluem:

- *enhancer* de vacina (administração da composição antes, durante ou simultaneamente à administração do antígeno) em quantidade efetiva para induzir o

aumento da resposta imune específica contra células malignas ou agentes infecciosos; e

- para induzir imuno-reconstituição de pacientes, independente da causa do problema advir de: Infecção, radiação, transplante (BMT, SCT) ou drogas;

Os polipeptídeos de IL-7 e composições da presente invenção podem ser usados isolados ou combinados com outros ingredientes ativos, tais como fatores linfopoiéticos, incluindo, mas não se limitando a, SCF, Flt3-L, α-IFN, γ-IFN, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-15, IL-18 e/ou IL-21. Quando for usada a terapia combinada, os vários ingredientes podem ser administrados simultaneamente, separados ou em sequência, e podem ser acondicionados juntos ou separados.

Os polipeptídeos de IL-7 e composições da presente invenção podem ser usados em várias áreas, incluindo intensificação de vacina em saúde animal, e para diminuir o número de administrações da substância ativa.

A presente invenção fornece, ainda, um método para tratamento de infecções virais, tais como infecção por HIV, hepatite viral, febre do Nilo ocidental e dengue, que consiste na administração da composição do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada ao paciente infectado.

Em uma modalidade específica, o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada deve ser administrado em associação com uma molécula de interferon, que pode ser, por exemplo, IFN-alfa (IFN leucócito), IFN-beta (IFN fibroblasto), IFN-gama (IFN imune) IFN-ômega ou IFN-tau (fator trofoblástico).

A invenção se refere, ainda, a um método para melhoria da recuperação timopoiética em indivíduos com o sistema imune comprometido; método esse, que consiste na administração ao paciente, da composição do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada.

De preferência, o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada deve, então, ser administrado em associação com um fator de crescimento de queratinócito, um fator de célula-tronco, um antagonista da gonadoestimulina ou com um hormônio de crescimento.

O polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada também pode ser utilizado em um método para imunização terapêutica contra células malignas, vírus ou bactérias, em que o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada deve ser administrado associado a um antígeno, ou mistura de antígenos como, por exemplo, os descritos acima. Nessa situação, o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada pode ser administrado em associação com GM-CSF.

Outro objeto da presente invenção é um método para estimular a expansão de células T, *ex-vivo*, caracterizado

por colocar essas células em contato com um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada ou uma composição dele promovendo, assim, a expansão das células. Esse método é particularmente útil no preparo de células T adequadas para tratamento de pacientes com câncer ou infecção viral, via imunoterapia adotiva. Essa imunoterapia é uma metodologia *ex vivo* para expansão seletiva de células T específicas visando antígenos específicos (malignos ou virais). Tal técnica imunoterapêutica inclui, geralmente, o isolamento de linfócitos T Ag-específicos do sangue do paciente, expansão *ex vivo* dessas células T com o emprego dos polipeptídeos de IL-7, ativação opcional, *ex vivo*, dessas células por outras citoquinas, e administração ao paciente. Outras técnicas são possíveis. Os polipeptídeos de IL-7 melhoram a sobrevivências dessas populações de células T que, posteriormente, apresentam maior atividade citotóxica.

Outro aspecto da presente invenção se refere à disponibilização de construtos e métodos adequados à produção das composições citadas acima, especialmente dos polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilada, suas composições e produtos, em quantidade suficiente e qualidade adequada ao uso farmacêutico.

Em particular, como discutido acima, a presente invenção fornece vetores e células hospedeiras recombinantes, que podem ser usadas na produção dos polipeptídeos de IL-7 recombinante humano dessa invenção,

em diversas células hospedeiras competentes, bem como para fins de terapia genética.

O vetor pode ser um plasmídeo, um vírus, um fago, um cosmídeo, um episssomo, etc. Vetores preferenciais são os virais (por exemplo, adenovírus recombinantes) e os plasmídeos, que podem ser produzidos a partir de estruturas disponíveis comercialmente, como pBR, pcDNA, pUC, pET, pVITRO, *etc.* O vetor contém, tipicamente, elementos reguladores ou sequências capazes de controlar ou mediar a expressão de um polipeptídeo de IL-7. As sequências reguladoras podem ser escolhidas entre promotores, estimuladores, silenciadores, sinais específicos de tecidos, peptídeos-sinais, introns, terminadores, sequências poli A, regiões GC, etc., ou combinação deles. Tais elementos ou sequências reguladores podem ser derivados de genes de mamíferos, fungos, plantas, bactérias, leveduras, bacteriófagos ou vírus; ou, ainda, de fontes artificiais. Promotores úteis para expressão de procariontes (como *E. coli*) incluem, por exemplo, a T7 RNA polimerase (pT7), TAC (pTAC), Trp, Lac, Ter e PhoA. Promotores adequados à expressão em células de mamíferos incluem os promotores virais (por exemplo, CMV, LTR, RSV, SV40, TK, pCAG, *etc.*), os de genes domésticos (por exemplo, E1f□, beta-actina de frango, ubiquitina, INSM1, *etc.*), os híbridos (por exemplo, actina/globina, etc.), etc. Um vetor pode conter mais de um promotor, o qual pode ser indutível ou regulado. Por exemplo, o uso de promotores indutíveis ou regulados permite um controle melhor da produção, pelo fato

de dissociar as fases de cultura e produção. Promotores indutíveis ou regulados podem ser encontrados na literatura. São exemplos, os sistemas Tetraciclina, Switch-Gene, Ecdisona, Estradiol, RU485, Cumato, o promotor metalotioneína, etc. Outros sistemas, como os de ultra-som focalizado, expressão induzida de AIR e assemelhados baseiam-se em correntes elétricas ou microondas. Esses sistemas podem ser usados para controlar a expressão de um polipeptídeo de IL-7 de acordo com a presente invenção.

A IL-7 pode ser co-expressada com um fator anti-apoptótico (por exemplo, iex, Bcl2, BclXL, *etc.*) ou ciclina (por exemplo, p21, p27, *etc.*). Os c-DNAs que codificam esses IL-7 e fatores anti-apoptóticos podem ser posicionados na parte inferior do mesmo promotor, mas separados por uma sequência IRES, ou cada um em seu promotor.

O vetor pode conter, ainda, uma origem de replicação e/ou gene marcador, os quais podem ser selecionados das sequências convencionais. Um marcador de amplificação de seleção, como o gene DHFR, pode ser inserido na estrutura do vetor. Este pode conter, ainda, várias combinações desses diversos elementos, os quais podem ser organizados de diferentes modos.

A presente invenção se refere também a células hospedeiras recombinantes contendo um ácido nucléico ou um vetor, como descrito acima. A célula hospedeira pode ser

escolhida entre quaisquer células eucarionte e procarionte, tipicamente de uma célula de mamíferos (particularmente, de seres humanos, roedores ou caninos), de bactéria (em especial, de *E. coli, Bacillus Brevis, Bacillus Subtilis*), de levedura, de planta e de inseto. Essas células hospedeiras podem ser adaptadas para meio sem soro. A produção pode ser feita também em um animal ou planta transgênicos.

As células hospedeiras recombinantes preferidas são selecionadas de células de mamíferos, em especial, de células humanas, bem como de derivados ou mutantes delas.

Exemplos específicos de células hospedeiras adequadas incluem células de ovário de hamster chinês (CHO), de rim de hamsters recém-nascidos (BHK), de rim de embrião humano (HEK-293), de queratinócitos de epiderme humana (HEK), de epitélio ou estroma humanos, PERC6, etc. Nessas células de mamíferos, a IL-7 pode ser produzida sob a forma de proteína secretada, usando sequências funcionais de peptídeos-sinais.

Um objeto específico da presente invenção é uma célula hospedeira eucarionte contendo uma molécula de ácido nucléico com a SEQ ID NO: 2, 4 ou 6.

Outro objeto da presente invenção se refere a anticorpos imunoreativos com uma composição ou polipeptídeo de IL-7, como descrito anteriormente. Esses anticorpos

podem ser produzidos por métodos convencionais, inclusive imunização de animais e coleta do soro (policlonal) ou preparação de hibridomas de células do baço (monoclonal) Fragmentos (por exemplo, Fab') ou derivados de anticorpos obtidos por bioengenharia (por exemplo, ScFv or *diabodies* ou *minibodies*) podem ser produzidos pelos métodos químicos e biológicos conhecidos. Anticorpos preferidos são especificamente imunoreativos com um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada, como já descrito, ou seja, podem ligar-se ao polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada sem ligar-se, substancialmente, a polipeptídeos mono- ou não-glicosilados. Embora se possa observar ligações não-específicas ou menos efetivas a esses outros antígenos, tais ligações podem ser distinguidas daquela específica feita com polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilados da presente invenção.

O anticorpo deve, preferencialmente, ser de origem símia, murínica ou humana ou, então, ter sido humanizado.

A invenção se refere também a uma linhagem celular de hibridoma, que produz um anticorpo monoclonal como descrito acima.

Esses anticorpos são úteis para detectar polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilada ou para neutralizar a atividade biológica da IL-7 em ensaios ou experimentos, que envolvam linfoquinas múltiplas. Uma composição adequada para

diagnóstico, análise ou terapia com esses anticorpos monoclonais também é objeto da presente invenção.

Outro objeto da presente invenção se refere a processos, que podem ser utilizados em escala industrial, para produção de um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada, substancialmente puro, com grau farmacêutico, como descrito acima. O processo leva a alto rendimento do confôrmero de IL-7 recombinante adequado ao uso terapêutico. A invenção fornece também, novos métodos de controle das composições contendo IL-7, de modo a determinar a presença de uma quantidade de polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada, como descrito acima.

Em particular, o método para produção de polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilada ou suas composições, como definido acima compreende :

a) cultivo de uma célula hospedeira recombinante como descrito acima; e

b) isolamento do polipeptídeo de IL-7 produzido por essas células.

A amostra pode ser submetida a diversos tratamentos, ou condições, a fim de aumentar a pureza da IL-7, remover debris celular ou partículas virais, etc. Exemplos típicos desses tratamentos incluem centrifugação, clarificação e/ou

dia-, ultra-, e nanofiltração. A amostra pode, assim, ser enriquecida no polipeptídeo de IL-7.

A fim de aumentar o rendimento ou a eficiência do método, é altamente desejável produzir uma amostra rica em polipeptídeos de IL-7 glicosilados e com *folding* correto.

O polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada pode ser purificado por diversas técnicas já conhecidas, mas que ainda não foram usadas na combinação aqui apresentada para produzir um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada. Essas técnicas são, de preferência, escolhidas entre cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca-iônica, cromatografia por afinidade e cromatografia de filtração em gel, sozinhas ou em combinações diversas. Esses métodos permitem a remoção do DNA da célula hospedeira e de outras impurezas, que diminuiriam a recuperação do material de interesse. Em uma modalidade preferida, a etapa ii) é o uso de cromatografia de interação hidrofóbica. Essa técnica cromatográfica pode ser realizada utilizando-se vários suportes e formatos, de preferência usando HIC-butila. A etapa ii) pode ser desenvolvida sobre qualquer suporte, de preferência em batelada, ou em coluna utilizando um gel apropriado.

Em uma modalidade preferida, a etapa de purificação é caracterizada pela passagem da amostra através de uma coluna empacotada com um gel específico (Sephadex, por exemplo).

Em outra modalidade, a etapa de purificação compreende uma etapa de "polimento", que envolve a passagem da amostra através de uma coluna empacotada com um gel específico (fonte 15S), a fim de concentrar a proteína de interesse e eliminar possíveis resíduos de contaminantes protéicos.

Em outra modalidade, a etapa de purificação consiste em passar a amostra através de uma coluna empacotada com um gel específico, que contenha um anticorpo monoclonal anti-IL7 imobilizado em resina (por exemplo, sulfato de dextrana ou heparina).

Esses métodos permitem uma produção eficiente e reprodutível do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada substancialmente puro, como descrito acima. Os métodos são particularmente vantajosos, já que a IL-7 recombinante pode ser obtida com pureza de, pelo menos, 95% em peso, especialmente pelo menos, 98% em peso e, particularmente pelo menos, 99% ou até mesmo 99,5% em peso em relação à quantidade total de IL-7.

Cada etapa do processo acima descrito pode ser controlada por métodos analíticos, inclusive análise por SDS-PAGE. A estrutura primária da IL-7 otimizada pode ser controlada e caracterizada determinando-se a sequência de genes e/ou de aminoácidos, pela análise do mapa de peptídeos, após digestão trípsica; pela determinação do peso molecular usando SDS-PAGE; por HPLC de exclusão de

tamanho de partículas; por espectrometria de massas com a técnica MALDI-TOF ou eletrospray, ou outra semelhante; por determinação da hidrofobicidade usando, por exemplo, HPLC de fase reversa, e/ou determinando-se a carga elétrica por meio de HPLC de troca catiônica ou iso-eletrofocalização, por exemplo.

Outra modalidade da presente invenção se refere a métodos de produção de IL-7, como descritos acima, onde a expressão dessa interleucina por células hospedeiras recombinantes é indutível, regulada ou transiente, de modo que as fases de cultura celular e expressão de IL-7 podem ser dissociadas. Especialmente, em outra modalidade, a expressão de IL-7 pode ser reprimida ou reduzida durante o crescimento, expansão e/ou cultura da célula recombinante, a fim de permitir a produção em grandes quantidades, dessas células, sem qualquer efeito tóxico potencial mediado pela IL-7. Assim, a expressão dessa interleucina pode ser induzida na cultura celular (ou em uma amostra dela), permitindo a síntese e liberação eficientes de IL-7 recombinante.

Um objeto da presente invenção reside, assim, também, em um método de produção de um polipeptídeo de IL-7 recombinante, que consiste no cultivo de células hospedeiras recombinantes como apresentado acima - contendo uma molécula de ácido nucléico, que codifica o dito polipeptídeo de IL-7-, e na recuperação desse polipeptídeo recombinante produzido, onde a citada molécula de ácido

nucléico fornece uma expressão regulada ou induzida do polipeptídeo de IL-7, de modo que a expressão desse polipeptídeo possa ser reprimida ou reduzida durante o crescimento da célula recombinante e induzida durante a fase de produção. O ácido nucléico, tipicamente, contém um promotor indutível, que pode ser reprimido ou ativado na presença, ou ausência, de um agente específico contido, ou adicionado, no meio de cultura. O método é particularmente adequado para a produção de um confôrmero de IL-7 hiperglicosilada como mostrado acima.

Vários sistemas de expressão regulada ou indutível já foram disponibilizados, os quais funcionam em células hospedeiras de mamíferos, e que podem ser usados na presente invenção. Esses incluem os sistemas Tetraciclina Tet-On/Off, Switch-Gene (Invitrogen) com Mifepristona como agente indutor e promotor GAL4-E1b, ecdisona (indução com ponasterona A ou muristerona A, análogos de hormônios esteroidais de insetos) (Invitrogen), promotor metalotioneína (indutível por zinco), estradiol, RU486, ultra-som focalizado, sistema de expressão induzida AIR (regulação indutível por acetaldeído), cumato (Q-mate; Qbiogen), Cre-Lox, etc. Esses sistemas de expressão regulada ou indutível podem ser utilizados em diversas células como, por exemplo, as linhagens celulares HEK293, HEK293 EBNA, HEK, T-REX™-293, T-REX™-HeLa, T-REX™-CHO ou T-REX™-Jurkat, transformadas com um vetor recombinante adequado para expressar IL-7 recombinante após a indução.

Alternativamente, a transfecção transiente pode ser usada para dissociar a expansão celular da produção de IL-7. A esse propósito, vetores eficientes de liberação de genes são usados para introduzir a sequência codificadora de IL-7 nas células após a expansão delas. De preferência, o sistema vetor para a transfecção transiente é um vetor viral, como um adenovírus recombinante ou um vetor episssomal - por exemplo, pCEPH (Invitrogen), pTT (IRB: Durocher Y. *et al.*, Nucl. Acids. Res. 2002, 30(2)), ou que utilize sequências MAR. Adenovírus (e outros vetores virais como, por exemplo, AAVs) podem ser produzidos por técnicas disponíveis, já conhecidas. Tipicamente, adenovírus E1-deficientes são produzidos em uma linhagem celular E1-complementadora, como HEK293, PERC6, etc. Esses processos de transfecção transiente podem ser implementados em diversas células cultivadas de mamíferos, como por exemplo as células transformadas A549-, HeLa-, VERO-, BHK- ou CHO- (como mostrado no exemplo A4). Um método alternativo e adequado para uso na presente invenção está apresentado, por exemplo, no artigo Durocher Y. *et al.*, Nucl. Acids. Res. 2002, 30(2) em células HEK293 EBNA ou HEK293.

Em uma modalidade da presente invenção, os métodos de produção possuem uma etapa adicional, etapa c), de caracterização e quantificação do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada, como descrito acima, no produto resultante. A caracterização física e biológica do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada desejado pode ser feita por espectrometria de massas (MALDI-TOF ou

eletrospray), espectroscopia no infra-vermelho, ressonância magnética nuclear (RMN), por dicroísmo circular, por análise da atividade biológica da IL-7 em um bio-ensaio específico, por medidas de afinidade frente a um anticorpo monoclonal específico desenvolvido contra o dito polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada, ou por HPLC de afinidade por heparina. Uma vez caracterizado, a quantificação do confôrmero em questão pode ser feita por meio de ELISA, bio-ensaio, afinidade do polipeptídeo de IL-7 pelo receptor de IL-7, ou por qualquer método de quantificação de proteína aplicado sobre o confôrmero isolado.

Em relação a isso, a invenção também apresenta um método de identificação e quantificação do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada e/ou impurezas relacionadas, em uma amostra; especialmente, em uma preparação farmacêutica. Tais métodos de caracterização podem ser usados, inicialmente, para caracterizar e qualificar a proteína quanto a um uso terapêutico, em controle de qualidade de lotes farmacêuticos. A invenção propõe um método inédito de caracterização e controle de preparações contendo IL-7, para determinação da presença e/ou da quantidade relativa do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada da presente invenção. Os métodos de preferência utilizam ensaio de proteína pelo método do ácido bicinconínico (BCA), SDS-PAGE, western blot, HPLC de exclusão, HPLC em fase reversa, HPLC de troca-iônica, HPLC de interação hidrofóbica, ensaio de aminoácido (AAA), iso-eletrofocalização (IEF), ELISA,

absorção no u.v. e/ou bio-ensaio. Esses métodos podem ser usados isolados ou em combinações diversas.

A invenção também disponibiliza um método para produção de uma droga ou composição farmacêutica contendo IL-7, composto das seguintes etapas: i) cultura de uma célula hospedeira recombinante, que expresse um polipeptídeo de IL-7; ii) isolamento do polipeptídeo, a fim de produzir uma droga contendo IL-7; iii) formulação dessa droga, a fim de produzir uma composição farmacêutica adequada para uso terapêutico ou como vacina. O método inclui, ainda, etapas de identificação, caracterização ou mensuração, na droga ou na composição farmacêutica obtida, da quantidade e/ou qualidade do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada como definido acima; de preferência, uma etapa de seleção da droga ou composição farmacêutica, que contenha como ingrediente ativo, mais de 90%, especialmente 95%, preferencialmente 98% do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada.

A etapa de caracterização pode utilizar diversas técnicas, particularmente métodos relacionados com a espectrometria de massas, com ou sem digestão trípsica, cromatografia de afinidade com lecitina, ensaio de aminoácido (AAA), digestão com endo- e exo- N- e O-glicanase (PNGase A/F, O-glucosidase, neuraminidase), eletroforese de carboidratos assistida por Fluorophore, espectroscopia de massas por MALDI-TOF ou eletrospray, análise de anticorpo monoclonal específico para ponte

dissulfeto e/ou caracterização de conformação. A identificação de variantes moleculares e impurezas relacionadas ao produto é feita, preferencialmente, por meio de um ou mais dos seguintes métodos: eletroforese bidimensional, focalização isoelétrica e cromatografia de troca-iônica, para as formas desaminadas; cromatografia de exclusão e SDS-PAGE, para formas multiméricas, e HPLC em fase reversa, com ou sem pré-digestão enzimática, para as formas truncadas.

Essa etapa é particularmente adequada para controle de qualidade de composições clínicas ou farmacêuticas, onde são retidas apenas as composições que possuem mais de 95% do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada, de preferência, mais de 96, 98 ou 99,5%. Em média, todos esses polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilada apresentam ponto isoelétrico abaixo de 6,5.

Outro objeto da presente invenção se refere ao uso de um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada recombinante obtido pelos processos descritos acima, para fabricação de uma composição farmacêutica, que evite ou trate doenças associadas à imunodeficiência, particularmente, que induza uma estimulação prolongada da linfopoiese, a fim de causar e/ou amplificar uma resposta imune, particularmente, uma resposta imune antígeno-específica.

Outro objeto da presente invenção se refere ao emprego de um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada, como

ferramenta para uso experimental e farmacológico em mamíferos, para aplicações veterinárias.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção serão descritos nos exemplos a seguir, os quais devem ser vistos como ilustrativos e não limitativos do escopo deste pedido.

EXEMPLOS

EXEMPLO A. CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS OTIMIZADAS, QUE CODIFICAM IL-7, HUMANA(H) E SÍMIA (S), EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A1. Construção de uma sequência de nucleotídeos otimizada, que codifica IL-7 humana:

1.1. Otimização do peptídeo-sinal:

Várias sequências de peptídeo-sinal foram testadas, porque a expressão de fragmentos de cDNA de IL-7 ligados pela posição 5' final ao peptídeo-sinal natural de IL-7 foi muito baixa.

As novas sequências de cDNA codificadoras de IL-7 humana foram obtidas quimicamente, a partir de matrizes de oligonucleotídeos sintéticos.

Diversas sequências de peptídeo-sinal foram testadas: peptídeo-sinal (PS) de proteínas de alta secreção (Barash

et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 2002, 294:835-842):

PS IL-7

MFHVSFRYIF GLPPLILVLL PVASS (SEQ ID NO:13)

PS EPO

MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLG (SEQ ID NO:14)

PS SEAP

MLLLLLLLGL RLQLSLG (SEQ ID NO:15)

PS IgGkappa

METDTLLLWV LLLWVPGSTG (SEQ ID NO:16)

PS Lactotransferina/vitronectina

MKLVFLVLLF LGALGVALA (SEQ ID NO:17)

PS Cistatina bis

MARPLCTLLL LMATLAVALA (SEQ ID NO:18)

Um novo PS híbrido EPO/IL-7

MGVHECPAWL WLLLSLLSLV LLPVAS (SEQ ID NO:19)

As sequências de cDNAs obtidas foram inseridas no vetor pTT5 (Durocher *et al.*; 2002; Nucl. Ac.Res.; 30) para expressão transiente em células de mamíferos, como HEK293 e CHO.

A fim de verificar a boa clivagem do peptídeo-sinal, o aminoácido N-terminal foi determinado em cada proteína obtida; a integridade da hIL-7 foi mantida.

Cistatina, IgC, EPO e o EPO/IL-7 mostraram ser as melhores sequências de peptídeo-sinal. Na verdade, a

expressão de hIL-7 foi aumentada por um fator de, pelo menos, 10.

1.2. Otimização da sequência de nucleotídeos codificadora da IL-7 humana:

Mantendo-se a sequência de aminoácidos do EP/7hIL-7, a sequência de ácidos nucléicos foi otimizada por:

- eliminação de códons humanos raros (usando o software Graphical Codon Usage Analyser - analisador gráfico de uso de códons);

- aumento da estabilidade do mRNA pelo aumento do conteúdo em "GC" da sequência, exceto para a sequência do peptídeo-sinal (Kim *et al.*; 1997; Gene; 199), e minimização da sucessão de dinucleotídeo "CA".

A sequência é apresentada na SEQ ID NO:2.

A2. Construção de uma sequência de nucleotídeos otimizada, que codifica IL-7 símia:

Como descrito para a sequência codificadora de IL-7 humana, sintetizou-se uma sequência otimizada EP/7-sIL-7 (SEQ ID NO:3).

A3. Construção de uma sequência de nucleotídeos otimizada, que codifica IL-7 canina:

cDNA de IL-7 canino foi amplificada por PCR a partir de uma biblioteca de CDNA de rim de cão (Biochain), clonada e seqüenciada como descrito acima para a sequência codificadora da IL-7 humana; sintetizou-se uma sequência de PSIL-7 ou PSEP/7-cIL-7 (SEQ ID NO:6).

A4. Expressão em mamíferos (Expressão de células BHK ou CHO ou HEK-293):

As sequências de cDNA codificadoras de IL-7 foram amplificadas por reação em cadeia de polimerase (PCR) (Mullis *et al.*; 1987; Methods in Enzymology; 155:335-350), a fim de criar os sítios de restrição (*NotI/SwaI*) para clonagem no vetor de expressão.

O sistema de expressão ph-pgk.EP7-hIL-7 (Fig. 1) ou pBh-pgk.EP7-hIL-7 (Fig. 2) foi criado para expressar uma proteína IL-7 predita pela tradução da sequência genética natural da IL-7 humana. A seleção das células recombinantes contendo o vetor foi feita com base nos genes marcadores de resistência a antibiótico (ampicilina para clonagem em *E. coli* e higromicina para expressão em células de mamíferos), carregados no vetor.

Esse vetor de expressão foi construído inteiramente na CYTHERIS, começando pelo plasmídeo plC20H (ATCC), que

confere ao sistema resistência à ampicilina. Ele contém duas unidades de produção em mamíferos:

1) uma para expressão das sequências codificadoras da IL-7, sob controle do promotor pgk, e uma sequência sintética poli A, que evita a transcrição através daquele promotor;

2) uma para expressão da resistência à higromicina, sob controle do "*enhancer* sv40- promotor tk".

As sequências a seguir foram inseridas nesse vetor preliminar:

- "hph-ef1a pA": Fragmento *Hind*III/*Sbf*I de pVitro2.mcs (Invitrogen);

- Promotor tk: Fragmento *Eco*RI/*Hind*III PCR de pMEP4 (Invitrogen);

- *Enhancer* sv40: Fragmento *Bss*HII/*Eco*RI PCR de pVitro2.mcs (Invitrogen);

- RLM de β-globina de coelho: Uma provável "Região de Ligação de Matriz" para melhor integração em região de alta transcrição da cromatina, fragmento *Eco*RV/*Age*I PCR intron2 de β-globina de coelho, da pSG5 (Stratagene);

- SpA: fragmento *Stu*I/*Bsp*EI do controle pCAT3 (Promega);

- Promotor Pgk: fragmento *Kpn*I/*Bss*HII PCR, do pQBI.pgk (Q-biogen);

- 5'UTRint1: Fragmento quimérico de intron *Hind*III, do controle pCAT3 (Promega);

- cDNA e mutantes, que codificam sítios *Not*I/*Swa*I ou *Not*I/*Pml*I de IL-7;

- hghpA: síntese de *Nru*I/*Swa*I a partir de sequência de cDNA de hormônio de crescimento humano descrita por M. Goodman (DeNoto *et al.*; 1981; Nucl. Acid. Res.; 9 (51):3719-3730).

Algumas variantes do vetor foram preparadas com outros promotores de IL-7 e não com pgk: Eflalfa, snRNA U1, actina, Ubiquitina, promotores CMV, etc.; ou com outro marcador genético: Neomicina, etc.

O vetor de expressão em mamíferos (HEK-293, CHO ou BHK) contendo SEQ ID NO: 2 é chamado ph-pgk.EP7-hIL-7 ou pBh-pgk. EP7-hIL-7. Expressão estável de IL-7 humano em células HEK-293 ou CHO transfectadas foi obtida usando-se o vetor de expressão ph-pgk.EP7-hIL-7 ou pBh-pgk.EP7-hIL-7. Após linearização com *Nde*I, o vetor de expressão ph-pgk.EP7-hIL-7 ou pBh-pgk.EP7-hIL-7 foi transfectdo em

células hospedeiras de mamíferos, utilizando-se métodos já conhecidos pelas versadas na técnica. O marcador genético usado para estabelecer transformantes estáveis foi a higromicina (Invitrogen).

A5. Expressão indutível em mamíferos (promotor de matalotioneína, MT1):

No mesmo vetor de expressão, o promotor pgk também foi sustituído por uma sequência quimicamente sintetizada de *BspEI/BssHII* "Mus musculus MT1", como descrito na PubMed (N° X53530) (Carter *et al.*; 1984; Proc.Natl. Acad. Sci. USA; 81:7392-7396).

MT1 é um promotor dependente de metal, do fator de transcrição. A expressão de clones estáveis é, portanto, dependente de zinco.

A6. Co-expressão em mamíferos de IL-7 e Bcl2 ou BclXL (Expressão de células BHK ou CHO ou HEK-293):

A fim de aumentar a viabilidade celular na cultura de células hospedeiras de mamíferos e, assim, otimizar as quantidades produzidas de IL-7, um plasmídeo de expressão variante foi preparado, enxertando-se a sequência cDNA Bcl2 entre o promotor tk e hph cDNA, de modo que a ação anti-apoptótica de Bcl2 pudesse ser testada em produção via bio-reator (Zhong *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993,

90:4533-4537 ; Lee *et al.*, Journal of Cell Science 2000, 114(4):677-684). (ver Fig. 2).

EXEMPLO B. CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS CODIFICADORAS DE ANÁLOGOS HIPERGLICOSILADOS DE IL-7, EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS:

B1. Construção de sequências de cDNA de análogos de IL-7 hiperglicosilada

Os análogos de IL-7 hiperglicosilada foram obtidos através de diversas técnicas, incluindo métodos de mutagênese. Análogos de IL-7 hiperglicosilada (alternativamente: HG37 -40 -104 -126 e -147) foram construídos, quimicamente, a partir de matrizes de oligonucleotídeos sintéticos. Diversos análogos foram obtidos pela introdução de uma ou mais mutações desejadas, de modo a se obter análogos de IL-7 contendo um ou mais sítios de glicosilação adicionais. Com isso, a sequência integral de cDNA, com um ou com múltiplos sítios adicionais de glicosilação, foi inserida após digestão com enzimas de restrição de *NotI* and *PmII,* no meio dos sítios de restrição de *NotI/PmlI* para clonagem direta no vetor de expressão (similar às Fig. 1 ou 2, mas com a sequência de IL-7 apropriada).

B2. Expressão de sequências de cDNA de análogos de IL-7 hiperglicosilada

A expressão dos análogos de IL-7 hiperglicosilada foi conduzida como descrito nas seções A4 a A6.

EXEMPLO C. PRODUÇÃO DE HIL-7 RECOMBINANTE EM CONDIÇÕES DE CULTURA EM BIO-REATOR

O clone positivo mais estável, como no exemplo A4, foi adaptado para cultura em suspensão livre de soro por meio de seleção de diversos meios e componentes, a fim de produzir um clone otimizado para produtividade e crescimento em cultura de alta densidade celular. Antes de semear o bio-reator de 100 a 2000L, foram feitas pré-culturas no sistema "wave bag". A cultura celular foi feita em bio-reator de 100 a 2000 litros, com sistemas de perfusão ou de batelada durante 10 a 15 dias. As células foram amplificadas até a concentração de 10 milhões de células/mL em meio com baixo teor de glutamina, suplementado por peptonas de plantas.

Em uma primeira etapa da expansão, a temperatura da cultura foi mantida em 37°C, para aumentar a densidade celular. Após alguns dias, a temperatura foi diminuída para cerca de 28 a 32°C, a fim de inibir o crescimento celular e permitir melhor nível de expressão. Além disso, o decréscimo da temperatura diminui a velocidade do caminho de secreção, favorecendo a glicosilação da IL-7 expressada, com aumento da ocupação dos sítios.

Poucos dias antes do fim da cultura, a expressão de IL-7 foi intensificada com a adição de butirato de sódio 0,5 a 10mM ao meio.

A expressão de IL-7 foi monitorada tanto no interior das células como no meio de cultura (Fig. 3), nas condições descritas acima.

Para produzir glicoformas de IL7 de alto PM, manteve-se glicose (3g/L) e glutamina (3mM) no meio, assim como boa oxigenação durante a cultura. Também se monitorou o consumo de aminoácidos e se acrescentou à cultura, os aminoácidos escassos. A cultura celular foi terminada assim que a viabilidade das células desceu abaixo de 90%.

EXEMPLO D. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE IL-7 HUMANO RECOMBINANTE, EXPRESSADO EM CÉLULAS HEK-293 E CHO

O meio de cultura celular foi recolhido, em estado bruto, e contrifugado, a fim de precipitar as células inteiras e os debris celulares. Alternativamente, o mesmo pode ser feito por filtração em cápsulas de filtração ou clarificação, como cápsulas Mustang XT (Pall), Sartoclear P (Sartorius), Millistak+ Opticap (Millipore) ou cartuchos de fibra porosa (AXH de fluxo cruzado 10 (GE)) ou equivalente. O meio de cultura centrifugado foi concentrado, em aparelho Centrasette Cassette com cut off de membrana de 10kDa (Pall Life Sciences), para reduzir o volume do sobrenadante a cerca de um décimo do inicial. Qualquer outro sistema de

filtração/concentração com porosidade semelhante poderia ter sido usado.

O supernadante concentrado foi centrifugado, seu pH ajustado a 7,5 e aplicado em coluna de Q Sepharose de fluxo rápido (General Electric Healthcare) equilibrada com fosfato de sódio 50mM (pH 7,5), sendo a proteína recuperada no eluato. Nessa etapa de cromatografia negativa, diversos contaminantes, entre os quais DNA, foram eliminados. Uma alternativa a essa etapa foi o emprego de cartuchos de membrana validados Mustang Q (Pall), em condições similares; esse processo é ligeiramente mais rápido e possui melhor rendimento. Outra alternativa é a captura da proteína por meio de uma resina fortemente trocadora de ânions, como Q Ceramic Hyper D (Biosepra), Capto Q (GE), ou de membrana (Sartobind Q, Sartorius).

Após essa etapa de purificação, o passo de captura foi realizado com uma resina fortemente trocadora de cátions. O eluato coletado ao final da etapa anterior foi aplicado em uma coluna Fractogel EMD $SO3^-$ (Merck) equilibrada com tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,5) e lavada com a mesma solução. A eluição foi feita com gradiente linear de NaCl (15 vêzes o volume da coluna) em fosfato de sódio 50mM, pH 7,5.

As frações ativas foram reunidas e inativadas, durante 30 minutos, em pH 3,5 à temperatura ambiente, para eliminação de vírus. Uma alternativa a esse processo é a

substituição da etapa de inativação viral por uma nanofiltração em multi-camada ao final do processo.

Após a inativação viral, as frações protéicas reunidas foram diluídas à metade com tampão de fosfato de sódio 200mM (pH 7) + sulfato de amônio 3M, e o pH ajustado a 7. A solução de proteína foi, então, aplicada em coluna de cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) - Butyl Toyopearl 650-M (Tosoh) -, equilibrada com tampão de fosfato de sódio 50mM (pH 7) + sulfato de amônio 1,5M. Após lavagem com o tampão, a IL-7 foi eluída com 25 vêzes o volume da coluna, de um gradiente salino de sulfato de amônio em fosfato de sódio 50mM (pH 7), variando de 1,5 a 0M.

Outras colunas de CIH, como *hexyl Toyopearl 650-M* (Tosoh), *Butyl/Octyl Sepharose™ 4 Fast Flow* (General Electric Healthcare), podem ser utilizadas para essa etapa. Outra alternativa à CIH, visando aumento de escala, foi a utilização de outra matriz, como a MEP HyperCel (Pall Biosepra), com resultados semelhantes.

A combinação da etapa de captura mencionada acima com a cromatografia de interação hidrofóbica levou a uma ótima separação das diferentes isoformas de IL-7 glicosilada (de B1 a B10, como indicado na Fig. 4), de acordo com suas propriedades físico-químicas intrínsecas. A seleção adequada das frações eluídas (frações B1 a B4) levou ao enriquecimento do material em hIL-7 3N-associado, ou não, à

forma 1O-glicosilada. Um exemplo de separação dessa glicoforma está mostrado na Figura 4.

As frações altamente glicosiladas de IL-7 foram reunidas e aplicadas em coluna Sephadex G25 (General Electric Healthcare), equilibrada com tampão de baixo teor salino (acetato de sódio 20mM, pH 6). Uma alternativa para essa etapa é filtrar o concentrado de alto teor salino usando membranas TFF com limite dos poros para peso molecular de 5 ou 10kDa, como as membranas Qvick start (GE) e Centramate TFF (Pall).

As frações protéicas obtidas da G25 foram aplicadas em coluna *Source 15S* (General Electric Healthcare), equilibrada com tampão de acetato de sódio 20mM (pH 6). Essa etapa resultou em concentração da proteína e eliminação dos contaminantes residuais.

A coluna foi lavada com tampão de acetato de sódio e a proteína IL-7 eluída com 15 vezes o volume da coluna, de um gradiente salino de NaCl, variando de 0 a 1M, em acetato de sódio 20mM (pH 6). As frações eluídas foram separadas por SDS-PAGE e coradas com azul Coomassie ou nitrato de prata. Apenas as frações contendo IL-7 foram reunidas para fornecer a porção final de proteína IL-7 purificada.

Se a inativação viral não tiver sido realizada antes, o processo de purificação pode incluir uma combinação adicional de duas filtrações, a fim de garantir uma ótima

eliminação dos vírus. Remoção destes pode ser feita por filtração, usando um dispositivo de pré-filtração (Planova 75, Asahi Kasei Medical), seguido de membranas de celulose nanoporosa (Planova 20N, Asahi Kasei Medical) ou outras membranas de remoção de vírus (Virosart, Sartorius ; DV20, Millipore).

SDS-PAGE de hIL-7 glicosilada e hiperglicosilada purificadas, derivadas de *E. coli*, estão apresentados na Figura 5.

Os deslocamentos no gel ilustram o nível de glicosilação da proteína. Em verdade, as formas hiperglicosiladas testadas (HG-37-147 e HG-40-104) têm peso molecular mais alto do que a IL-7 totalmente glicosilada.

EXEMPLO E. ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS DA GLICOPROTEÍNA

A produção da IL-7 recombinante humana foi feita em um sistema de expressão baseado em células CHO pelas seguintes razões, embora não apenas por elas: As células CHO são, atualmente, as hospedeiras mais comuns e mais validadas para produção de glicoproteína recombinante humana para uso terapêutico. Além disso, um grande número de trabalhos detalhados relataram que as células CHO, inclusive as linhagens geneticamente modificadas para expressar sialil-α-1-6 transferase, são capazes de glicosilar proteínas recombinantes de modo qualitativamente semelhante ao

observado em células humanas. Esse aspecto particular foi de importância fundamental para reduzir a imunogenicidade potencial da glicoproteína recombinante quando injetada em seres humanos.

Os produtos ou frações de IL-7 recombinante humano purificado, enriquecidos em glicoformas particulares (3N ou 3N+2N, associados, ou não, à porção 1O-glicana), obtidas de células CHO transfectadas, foram analisados por western blot a fim de confirmar o grau de glicosilação, em comparação com o IL-7 recombinante humano derivado de *E. coli*.

As diferentes glicoformas de IL-7 purificadas, produzidas por meio de células CHO, foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os pesos moleculares aparentes das glicoproteínas variaram entre 20 kDa e 35kDa, com uma banda mais intensa ao redor de 27kDa (observada no SDS-PAGE. Ver Fig. 5 e 6), provavelmente correspondendo à forma 3N-glicosilada contendo, ou não, uma porção O-glicana. Esse aspecto especificamente, foi tratado por desglicosilação enzimática do produto purificado (Fig. 7).

Essas glicoformas (3N ou 3N+2N associadas, ou não, à porção 1O-glicana) da IL-7 purificada, produzida por meio de células CHO, foram caracterizadas por espectrometria de massas, fornecendo massa molar superior a 25kDa para a 3N-glicoforma associada, ou não, à porção 1O-glicana, e maior

que 23kDa para a 2N-glicoforma associada, ou não, à porção 1O-glicana (v. Fig. 8).

Além disso, as formas glicosiladas acima apresentam ponto isoelétrico médio de 5,8, refletindo um perfil de alta sialilação (v. Fig. 9).

Para efeito de comparação, uma análise semelhante foi efetuada com hIL-7 não-glicosilada, derivada de *E. coli*, fornecendo uma proteína de peso molecular aparente de, aproximadamente, 18kDa, e com hIL-7 hiperglicosilada derivada de células de mamíferos, que apresentaram peso molecular aparente entre 27 e 37kDa.

A complexidade geral da glicosilação e a heterogeneidade total de N-glicanas do hIL-7 purificado, derivado de células CHO, foram avaliadas por desglicosilação total enzimática seguida de separação cromatográfica e análise por espectrometria de massas dos oligossacarídeos gerados.

Amostras purificadas de hIL-7 glicosilada foram digeridas enzimaticamente com uma endoglicosidase, como a peptídeo-N-glicosidase F (PNGaseF, Roche). Os oligossacarídeos N-ligados obtidos foram separados da estrutura peptídica e agrupados por tamanho com uma coluna de grafite, Carbograph 200-300µl (Alltech), seguida por espectrometria de massas usando a técnica MALDI-TOF (Voyager Spec, Applied Biosystems). Os valores de m/z

correspondentes a cada pico no espectro de massas permitiram a identificação da estrutura geral de N-glicana da molécula integral de hIL-7.

Para detecção específica das glicanas contendo ácido siálico, foi feita uma carboximetilação dos oligossacarídeos gerados com a PNGase (segundo o método descrito por Powell AK & Harvey DJ, Rap. Com. Mass Spec. 1996) antes da análise por espectrometria de massas.

Análise do espectro gerado pela hIL-7 derivada de células CHO revelou massas entre 1340 e 3516Da para as N-glicanas. (v. Fig. 10).

Pelo espectro pode-se determinar a seguinte estrutura glicânica (v. Tabela 3):

TABELA 3

m/z	Atribuição dos ions moleculares observados
1338	$Hex_3HexNAc_4 + Na^+$
1448	$Hex_4(dHex)HexNAc_4 + Na^+$
1485	$Hex_3(dHex)HexNAc_4 + Na^+$
1647	$Hex_4(dHex)HexNAc_4 + Na^+$
1809	$Hex_5(dHex)HexNAc_4 + Na^+$
1824	$Hex_3(dHex_2)HexNAc_5 + Na^+$
1970	$Hex_5(dHex)HexNAc_4(Sulph)_2+2Na^+$
2012	$Hex_5(dHex)HexNAc_5 + Na^+$

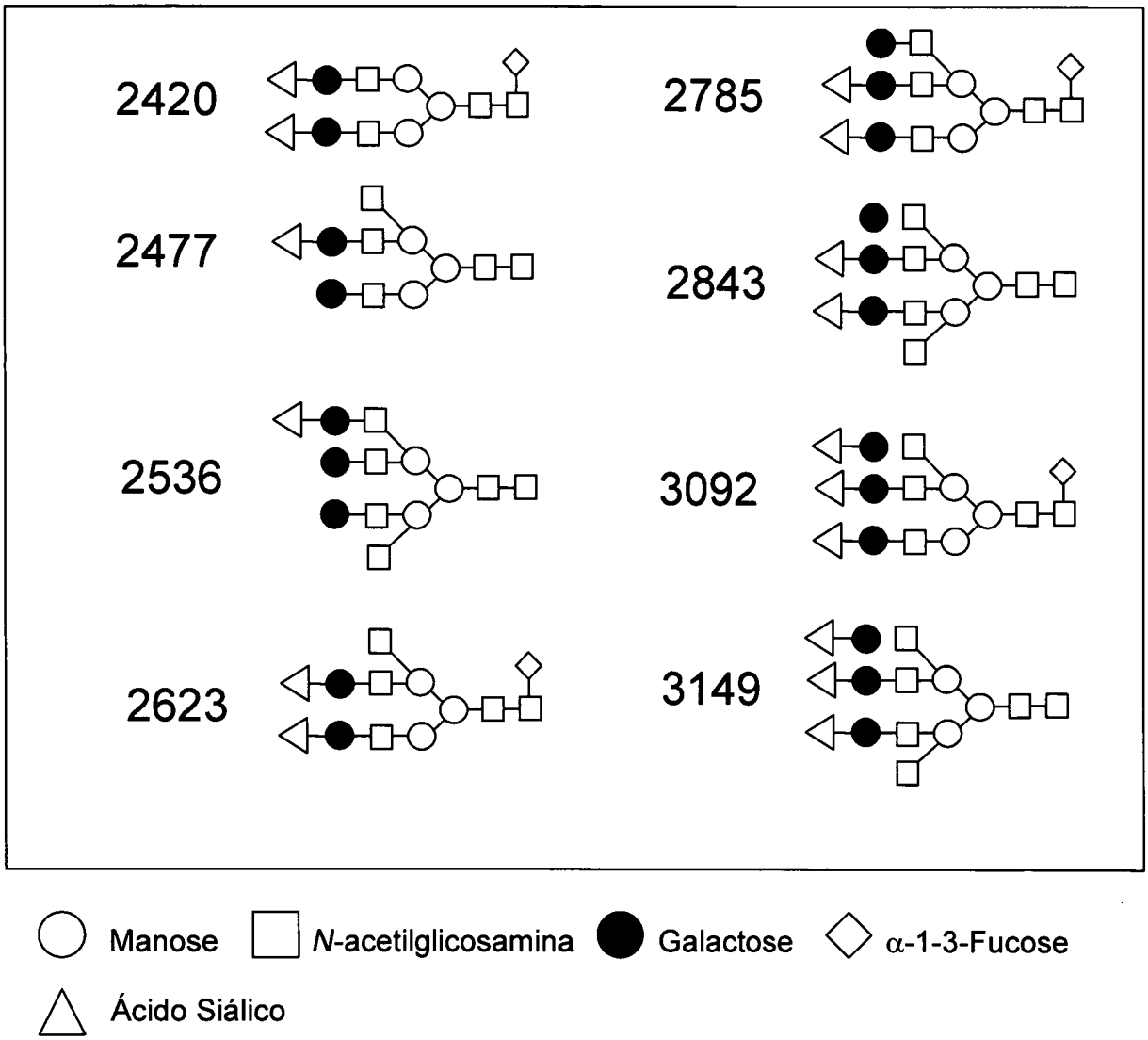
2157	$NeuAcCarboxiHex_4(dHex)HexNAc_5 + Na^+$
2182	$NeuAcHex_5(dHex)HexNAc_4Sulph + Na^+$
2318	$NeuAcCarboxiHex_5(dHex)HexNAc_5 + Na^+$
2421	$Hex_3(dHex)HexNAc_8(Sulph) + Na^+$
2536	$NeuAcCarboxiHex_6HexNAc_6 + Na^+$
2624	$NeuAc2CarboxiHex_5(dHex)HexNAc_5 + Na^+$
2786	$NeuAc2CarboxiHex_6(dHex)HexNAc_5 + Na^+$
2843	$NeuAc2CarboxiHex_6HexNAc_6 + Na^+$
3092	$NeuAc3CarboxiHex_6(dHex)HexNAc_5 + Na^+$
3153	$NeuAc3CarboxiHex_6HexNAc_6 + Na^+$

Hex: hexose (galactose ou manose), HexNAc : N-acetilhexosamina (N-acetil glucosamina ou N-acetil galactosamina), dHex : desoxihexose (Fucose), Sulph : grupo sulfato, NeuAc : ácido N-acetil neuramínico

Levando-se em conta i) as massas respectivas das porções de oligossacarídeos observados; ii) a massa de cada monossacarídeo, e iii) as regras dos caminhos biossintéticos das glicanas, como conhecidas atualmente, podem-se admitir, com boa probabilidade de acerto, as seguintes estruturas para as N-glicanas altamente complexas.

TABELA 4:

Complexos bi- e triantenários de N-glicanas de mamíferos, caracterizadas com base em hIL-7 derivado de células CHO (mas não limitadas a ela)



A complexidade da glicosilação foi avaliada, também, por meio da determinação da razão molar de diversos monossacarídeos encontrados em todas as glicanas (N- e O-glicanas, quando aplicável) da hIL-7 purificada derivada de células CHO.

Todas as glicanas das amostras de hIL-7 glicosilada purificada, foram tratadas quimicamente, por reação de metanólise, a fim de hidrolisar todas as ligações glicosídicas entre os açúcares. Os monossacarídeos obtidos foram separados da estrutura peptídica e agrupados por tamanho, usando equipamento de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (Gas Chromatography-Mass Spectrometry Automass, Finnigan). A razão molar foi determinada em relação a padrão interno conhecido e ao conteúdo de 3-manose de uma N-glicana clássica de mamífero.

Essa análise forneceu a seguinte razão molar para a hIL-7 derivada de células CHO.

TABELA 5

Monossacarídeo	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc
Massa Molar	164	180	180	221	221	309
Área do Pico	43382	179120	310124	33650	344476	423587
N° de nanomoles	5,41	24,76	22,15	5,26	27,29	20,94
Razão Molar	0,73	3,35	3	0,71	3,69	2,83

A heterogeneidade do padrão de N-glicanas de sítios específicos da hIL-7 derivada de células CHO foi avaliada por meio de digestão com endoprotease, seguida por

fracionamento e análise por espectrometria de massas dos peptídeos gerados.

Amostras purificadas foram digeridas com tripsina, ou outra endo-protease, a fim de gerar os glicopeptídeos correspondentes a cada sítio de N-glicosilação da IL-7 expressada. Cada glicopeptídeo foi identificado através do micro-sequenciamento N-terminal e de seu tempo de retenção específico em HPLC em fase reversa. Cada glicopeptídeo foi, assim, purificado. A heterogeneidade das N-glicanas, obtida através dos glicopeptídeos, foi analisada por EM-MALDI-TOF (Q Star, Applied Biosystems). Os valores de m/z correspondentes a cada pico no espectro de massas permitiram a identificação do padrão da N-glicana de cada sítio especificado na hIL-7.

O padrão de O-glicosilação foi avaliado através do uso de lecitinas específicas para O-glicanas (blot de lecitina, Fig. 11).

Amostras puras de hIL-7 derivadas de células CHO foram separadas por SDS-PAGE e aplicadas em membranas PVDF. Proteínas imobilizadas foram testadas com PNA (aglutinina de amendoim) e/ou MAA (aglutinina de *Maackia amurensis*) marcadas com peroxidase (mas não só com elas) e coradas para visualização.

A heterogeneidade e composição das glicanas foram determinadas, também, através da afinidade de lecitina pela hIL-7 derivada de células CHO, pura.

Um conjunto de lecitinas com afinidade por estruturas de N- e O-glicanas foi selecionado e usado para recobrir 96 cavidades em microplacas de testes. Quantidades idênticas de preparações de IL-7 recombinante purificadas foram incubadas nessas microplacas. Durante essa etapa, quantidades diferentes de IL-7 mantiveram-se ligadas à lecitina de acordo com a afinidade de cada lecitina à glicana ligada à IL-7. A revelação foi feita incubando-se um anticorpo específico para IL-7, junto com biotina. O "sanduíche" de lecitina-IL-7-Ab foi revelado por um complexo de streptavidina-peroxidase.

Oito lecitinas diferentes foram utilizadas na caracterização das amostras purificadas de IL-7. Cada lecitina reconhece porções específicas de açúcares. Os motivos e as especificidades estruturais das glicanas estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: resumo do padrão de açúcares reconhecidos pelas lecitinas e inventário dos motivos e especificidades estruturais das glicanas correspondentes

LEA é a lecitina de *Lycopersicon esculentum*,
WGA de *Triticum vulgare*,
UEA.I de *Ulex europeus*,

MAA de *Maackia amurensis*,

ACA de *Amaranthus caudatus*,

AIA de *Artocarpus intergrifolia*,

ABA de *Agaricus bisporus*,

PHA.L de *Phaseolus vulgaris*.

TABELA 6

Nome	Glc	GlcNAc	Man	Fuc	NeuAc	GalNAc	Gal	Especificidade estrutural das glicanas
LEA		+						oligômeros de GlcNAcβ4GlcNAc e N-acetil lactosamina
WGA		+			+			GlcNAc, cerne de glicanas N- ligadas, Neu5ac
UEA I				+				Fucose
MAA					+			Neu5Acα-3Galb4GlcNAc-
ACA						+		Galb3GalNAcα-O-R (antígeno T)
AIA							+	Gala6 ou Galβ3GalNAc (antígeno T), lactose
ABA							+	Gal-GalNAcα-O-R, glicanas O-ligadas
PHA L								Galb4GlcNAcβ6Man, N-glicanas ramificadas complexas

Os resultados estão mostrados na Fig. 12.

As lecitinas demonstram, claramente, afinidade diferencial, fornecendo informações sobre a estrutura geral do padrão de glicanas acessíveis na proteína purificada de IL-7, em solução.

Assim, ACA, ABA e AIA têm afinidade por Gal e GalNAc. As três lecitinas respondem positivamente, sugerindo a presença de estruturas de N- e O-glicanas contendo esses monossacarídeos. O sinal específico obtido com ABA revela a presença de estruturas de O-glicanas. ACA apresentou um sinal fraco, em comparação com o de AIA; ABA apresentou sinal ainda mais fraco. Isso mostra que as O-glicanas estão espalhadas, havendo pouco GalNAc como resíduo terminal.

LEA tem afinidade por GalNAc, indicando a presença de estruturas de N-glicana. Entre as lecitinas específicas para GlcNAc testadas (dados não apresentados), apenas aquelas com afinidade pela N-acetil lactosamina apresentaram sinal positivo.

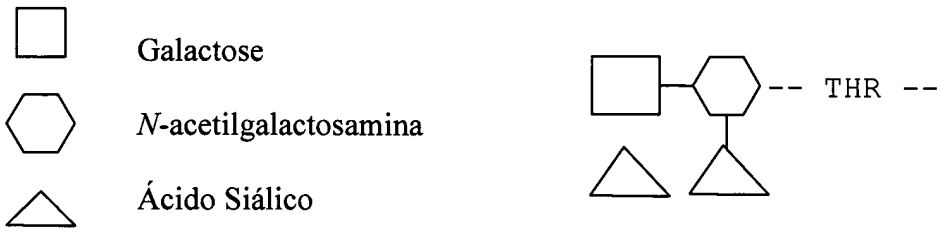
A WGA apresentou um sinal fraco, devido à baixa afinidade por estruturas internas de glicanas N-ligadas. N-glicanas altamente complexas mascaram a estrutura interna e tornam a afinidade de lecitina difícil de operar.

A UEA.I tem afinidade específica por fucose ramificada. A ligação foi relativamente fraca, indicando fucosilação incompleta, porém efetiva, das N-glicanas.

A MAA tem afinidade por ácidos siálicos terminais. Seu sinal foi forte, indicando sialilação efetiva tanto nas N- quanto nas O-glicanas.

A PHA.L tem afinidade por estruturas ramificadas complexas de N-glicana e apresentou sinal forte, corroborando os resultados obtidos com MAA. O sinal de PHA.L sugere a presence de N-glicanas grandes, tri- ou tetrantenárias.

As O-glicanas mais típicas de mamíferos caracterizadas em hIL-7 derivada de células CHO (onde aplicável) são:



Em conjunto, essas análises indicam que o sistema de expressão utilizado, baseado em células CHO, gera oligossacarídeos complexos (triantenários) N-ligados de IL-7 humana, como mostrado na figura a seguir, ramificados em seu resíduo ASN nas posições 70, 91 e 116 com sialilação parcial elevada a completa, de até 10 resíduos de ácido siálico. A IL-7 derivada de células CHO também contém uma O-glicana na posição T110.

Assim, embora contendo N- e O-glicanas sialiladas complexas, a amostra de IL-7 purificada ainda contém uma mistura de proteínas total e parcialmente glicosiladas.

EXEMPLO F. DA SUBSTÂNCIA ATIVA AO PRODUTO ATIVO: FORMULAÇÃO, ESTOCAGEM E ESTABILIDADE DE LONGO PRAZO DO HIL-7 RECOMBINANTE EXPRESSADO EM CÉLULAS CHO.

A pesquisa pela formulação ideal da droga foi conduzida através de um estudo de matriz combinatória, a fim de avaliar o impacto de diversas condições estressantes (temperatura, tampão, pH, concentração de modificador de tonicidade, agitação, iluminação intensa) sobre a estabilidade de longo prazo da proteína purificada.

A IL-7 recombinante humana purificada, altamente complexa, mostrou-se estável em tampões de acetato e de succinato, em concentrções entre 5 e 50mM. Os valores de pH adequados ficaram entre 5,0 e 7,0 e as temperaturas ideais de estocagem, entre -20°C e +4°C.

Açúcares e pequena concentração de surfactantes (polímeros de polissorbato) podem ser adicionados à preparação a fim de evitar formação de agregado não-covalente solúvel.

Nessas condições, a IL-7 pode ser estocada a +4°C (sob a forma líquida) em concentrações entre 0,5 e 8,0 mg/mL, preferencialmente entre 2,0 e 4,0mg/mL, por mais de 12

meses. A composição farmacêutica na forma líquida apresenta um melhor perfil de estabilidade.

EXEMPLO G. ANÁLISE DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA DE IL-7 RECOMBINANTE HUMANA, DERIVADA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS, EM BIO-ENSAIO ESPECÍFICO

A atividade biológica específica de IL-7 recombinante humana, derivada de células de mamíferos, foi avaliada em um bio-ensaio específico frente à linhagem de células murínicas pré-B, PB-1 (German Cell Bank DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikrooganismen und Zellkulturen), derivadas de células da medula óssea de camundongos CBA/C57BL, sendo essa linhagem celular estritamente dependente de IL-7 para o seu crescimento (Mire-Sluis *et al.*; 2000; J. Immunol. Methods; 236:71-76). Essas células foram mantidas em cultura em meio comercial contendo IL-7, e privadas de IL-7 antes do início do bio-ensaio.Este foi conduzido em amostras de IL-7 a serem testadas, em paralelo com um controle positivo contendo IL-7 derivado de *E. coli*, e um controle negativo isento de IL-7.

A IL-7, dos controles ou das amostras, adicionada à cultura celular induziu o re-início da proliferação das células, dependente da dose. Durante esse processo, houve incorporação de timidina radiomarcada (3H-Tdr, Amersham) pela células em divisão. O teor de marcação foi medido por contagem beta, em contagens por minuto (cpm), em cintilador líquido (Wallack).

Alternativamente, esse bio-ensaio pode ser realizado usando um corante marcador, que reflita o metabolismo geral da célula, tal como o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol, reduzido pela atividade redox mitocondrial) ou o MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol).

Diluições em série do controle positivo e das amostras de teste permitiram a plotagem do número de cpm em relação à quantidade de amostra/controle ensaiada.

A Figura 13 apresenta dados cinéticos de dose-resposta e curvas obtidas como rotina em um bio-ensaio típico: o crescimento de células PB-1 foi induzido por r-hIL-7 não-glicosilada (expressada em *E. coli*), ou por r-hIL-7 altamente glicosilada (produzida em células de mamíferos). (Os pontos representam a média ± SD de determinações em triplicata).

A Figura 14 apresenta dados cinéticos de dose-resposta e curvas obtidas como rotina em um bio-ensaio típico: o crescimento de células PB-1 foi induzido por r-hIL-7 não-glicosilada (expressada em *E. coli*), altamente glicosilada ou hiperglicosilada (produzida em células de mamíferos). (Os pontos representam a média ± SD de determinações em triplicata).

O parâmetro importante a ser considerado para cada amostra foi a ED50, que é igual à concentração (ng/mL) que fornece a metade da atividade máxima. Um valor mais alto de ED50 significa menor atividade.

A comparatibilidade das atividades entre os lotes de IL-7 foi avaliada pela análise dos parâmetros da curva de dose-resposta, como coeficiente de inclinação, no ponto de atividade máxima. A concentração ED50 (em ng/mL) aglutina as variações de todos os parâmetros de curva. A ED50 corresponde à dose de IL-7 necessária para induzir metade da atividade máxima de indução possível, *in vitro*. Com relação a isso, a moléculas altamente reativas correspondem baixos valores de ED50, enquanto altas concentrações ED50 serão características de preparações de IL-7 menos bioativas *in vitro*.

Apesar disso, na presente invenção, diferenças de bioatividade *in vitro* não representam, necessariamente, diferenças semelhantes *in vivo*.

EXEMPLO H. AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE *IN VIVO* DE POLIPEPTÍDEOS DE IL-7 HIPERGLICOSILADA EM PRIMATAS

IL-7 hiperglicosilada de símios (sIL-7), expressa em linhagem celular CHO (exemplos A2, A6 e B) e purificada conforme o exemplo D, foi avaliada *in vivo*, quanto à ocorrência de imunogenicidade potencial após administrações repetidas em primatas normais.

Macacos Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (n=4) jovens adultos, não previamente tratados, foram incorporados ao estudo e receberam sIL-7 hiperglicosilada na dose de 100 µg/kg/injeção. Esses animais receberam um total de seis administrações subcutâneas de IL-7 em um período de cinco semanas consecutivas. Os animais foram observados clinicamente durante dois meses. Amostras de sangue foram colhidas durante o estudo, em diferentes épocas: um dia antes da administração de sIL-7, no dia 37 e no final do estudo.

Todos os animais sobreviveram e não apresentaram reações adversas à terapia com sIL-7. A administração de sIL-7 foi localmente bem tolerada. Quando os soros dos animais tratados foram testados quanto à interferência em um teste ELISA específico para detectar anticorpos de ligação, nenhum anticorpo anti-IL-7 foi detectado. Em comparação, em um protocolo semelhante, IL-7 recombinante derivada de *E. coli*, embora produzida como um produto de alta pureza, induziu a produção de altos títulos de anticorpos de ligação a IL-7 em soros, entre 1:400 e 1:5000.

EXEMPLO I. ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VIVO* DE POLIPEPTÍDEO DE IL-7 HIPERGLICOSILADA EM PRIMATAS

IL-7 hiperglicosilada humana (hIL-7) expressa em linhagem celular CHO (exemplos A1, A6 e B) e purificada

como no exemplo D foi avaliada, *in vivo*, para determinação dos perfis farmacodinâmico e farmacocinético em primatas normais.

Macacos Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) adultos jovens, não previamente tratados, foram incorporados à pesquisa e divididos em dois grupos: não-tratados (n=2) e tratados com 100 µg de hIL-7 por kg por injeção (n=2). Amostras de sangue foram colhidas durante o estudo, em diferentes épocas: nos dias 1 (0, 3, 6, 9 e 12 horas após a injeção), 2, 3, 4, 7, 21 e 45.

A administração de hIL-7 foi bem tolerada, sem reação no local da injeção. Após administração subcutânea de dose única de hIL-7 nos macacos, o padrão e os parâmetros farmacocinéticos da hIL-7 foram estabelecidos, após as primeiras 72 horas:

- O perfil plasmático mostrou declínio bi-exponencial após pico de absorção.

- A meia-vida observada para o produto no plasma ficou entre 30 e 40 horas. Esse valor é significativamente alto, quando comparado com a meia-vida observada para IL-7 recombinante derivado de *E. coli* (5 a 8 horas) administrado nas mesmas condições. Isso reflete uma maior estabilidade do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada no sangue, *in vivo*.

- O tempo de residência médio (TRM) foi de 40 horas, contra cerca de 10 horas para o produto derivado de *E. coli*.

- O tempo necessário para atingir a concentração máxima foi de 180 minutos.

Em resumo, o estudo farmacocinético mostrou que o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada da presente invenção apresenta perfil farmacocinético melhor e mais prolongado, o que se traduz em melhores efeitos farmacodinâmicos.

A injeção única de hIL-7 na dose de 100 µg/kg induziu um aumento significativo no número de células T $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ periféricas. Esse aumento foi de, respectivamente, 200% e 170% em relação aos valores observados antes do início do tratamento. O número de linfócitos T (CD4 e CD8) que expressam, transientemente, a cadeia alfa do receptor específico da IL-7 (CD127) diminui no sangue periférico seis horas após a injeção. Os linfócitos T que expressam CD127 reaparecem no sangue periférico 48 horas após a injeção, retornando aos valores iniciais somente 7 dias após a dose. Após a administração subcutânea, em dose única, da IL-7 recombinante derivada de *E. coli*, os valores iniciais de linfócitos T que expressam CD127 só voltam integralmente aos valores iniciais depois de 4 dias. A cinética de ocupação do receptor do polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada é mais demorada, em comparação com a da

IL-7 recombinante derivada de *E. coli*, refletindo a meia-vida maior daquele peptídeo em primatas, como mostrado abaixo. Esses resultados estão de acordo com dados anteriores, que mostram que embora a administração i.v. de IL-7 resulte em maior biodisponibilidade, não se traduz em melhores efeitos farmacocinéticos. Na verdade, o perfil de liberação prolongada obtido pela injeção subcutânea é mais eficiente do que o perfil de liberação rápida obtido com a injeção i.v. Nesse caso, a hiperglicosilação da proteína induz um perfil cinético prolongado que, por sua vez, se traduz em melhor atividade farmacodinâmica. Em virtude desse perfil prolongado, espera-se também uma maior tolerância clínica, uma vez que os efeitos colaterais das drogas estão, geralmente, ligados a picos de concentração.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Requerente: Cytheris

<120> Título: POLIPEPTÍDEOS DE IL-7 GLICOSILADA, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E USOS

<130> Referência do documento: B0346WO

<160> Quantidade de SEQ ID NOs.: 19

<170> Software: PatentIn Version 3.1

<210> SEQ ID NO.: 1
<211> Comprimento: 152
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Seqüência: 1

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> SEQ ID NO.: 2
<211> Comprimento: 540
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Características:
<221> Nome/chave: CDS
<222> Localização: (1)...(537)
<223> Outras informações: EPy7-hIL7 otimizada

<400> Seqüência: 2

```
atg ggt gtt cat gaa tgt cct gct tgg ttg tgg ttg ttg ttg tct ttg      48
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1               5                  10                  15

ttg tct ttg gtt ctg ttg cct gta gcc tct gat tgc gat att gaa ggg      96
Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly
            20                  25                  30

aaa gat ggg aag cag tat gag tcc gtg ctg atg gtg agc atc gat caa     144
Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln
        35                  40                  45

ttg ttg gac tcc atg aaa gaa att ggg agt aac tgc ctg aat aac gaa     192
Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu
    50                  55                  60

ttt aac ttc ttt aag cgc cat atc tgt gat gct aat aag gaa ggt atg     240
Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met
65                  70                  75                  80

ttt ttg ttc cgc gct gct cgg aag ttg cgc cag ttc ctt aag atg aac     288
Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn
                85                  90                  95

tct act ggt gat ttc gat ctc cac ctc ctg aaa gtt tcc gaa ggg act     336
Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr
            100                 105                 110

act atc ctg ttg aac tgc act ggc cag gtt aaa gga aga aaa ccc gct     384
Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala
        115                 120                 125

gcc ctg ggt gaa gcc caa ccg aca aag agt ttg gaa gaa aat aaa tct     432
Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser
    130                 135                 140

ttg aag gaa cag aag aag ctg aac gac ttg tgt ttc ctg aag cgc ctg     480
Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu
145                 150                 155                 160

ttg cag gag att aag act tgt tgg aat aag atc ttg atg ggg act aag     528
Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys
                165                 170                 175

gag cat tga taa                                                    540
Glu His
```

<210> SEQ ID NO.: 3
<211> Comprimento: 178
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Seqüência: 3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly
20 25 30

Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln
35 40 45

Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu
50 55 60

Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met
65 70 75 80

Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn
85 90 95

Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr
100 105 110

Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala
115 120 125

Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser
130 135 140

Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu
145 150 155 160

Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys
165 170 175

Glu His

<210> SEQ ID NO.: 4
<211> Comprimento: 537
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Símio

<220> Características:
<221> Nome/chave: CDS
<222> Localização: (1)...(537)
<223> Outras informações: EPy7-sIL-7 otimizada

<400> Seqüência: 4

```
atg ggt gtt cat gaa tgt cct gct tgg ttg tgg ttg ttg ttg tct ttg       48
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1               5                   10                  15

ttg tct ttg gtt ctg ttg cct gta gcc tct gat tgc gat att gaa ggg       96
Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly
            20                  25                  30

aaa gat ggg aag cag tat gag tcc gtg ctg atg gtg agc atc gat caa      144
Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln
        35                  40                  45

ttg ttg gac tcc atg aaa gaa att ggg agt aac tgc ctg aat aac gaa      192
Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu
    50                  55                  60

ttt aac ttc ttt aag cgc cat ctg tgt gat gat aat aag gaa ggt atg      240
Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Leu Cys Asp Asp Asn Lys Glu Gly Met
65                  70                  75                  80

ttt ttg ttc cgc gct gct cgg aag ttg cgc cag ttc ctt aag atg aac      288
Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn
                85                  90                  95

tct act ggt gat ttc gat ctc cac ctc ctg aaa gtt tcc gaa ggg act      336
Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr
            100                 105                 110

act atc ctg ttg aac tgc act ggc aag gtt aaa gga aga aaa ccc gct      384
Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Lys Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala
        115                 120                 125

gcc ctg ggt gaa ccc caa ccg aca aag agt ttg gaa gaa aat aaa tct      432
Ala Leu Gly Glu Pro Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser
    130                 135                 140

ttg aag gaa cag aag aag ctg aac gac tcc tgt ttc ctg aag cgc ctg      480
Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser Cys Phe Leu Lys Arg Leu
145                 150                 155                 160

ttg cag aag att aag act tgt tgg aat aag atc ttg atg ggg act aag      528
Leu Gln Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys
                165                 170                 175

gag cat tga                                                         537
Glu His
```

<210> SEQ ID NO.: 5
<211> Comprimento: 178
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Símio

<400> Seqüência: 5

```
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1               5                   10                  15

Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly
            20                  25                  30
```

Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln
35 40 45

Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu
50 55 60

Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Leu Cys Asp Asp Asn Lys Glu Gly Met
65 70 75 80

Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn
85 90 95

Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr
100 105 110

Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Lys Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala
115 120 125

Ala Leu Gly Glu Pro Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser
130 135 140

Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser Cys Phe Leu Lys Arg Leu
145 150 155 160

Leu Gln Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys
165 170 175

Glu His

<210> SEQ ID NO.: 6
<211> Comprimento: 480
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Canino

<220> Características:
<221> Nome/chave: CDS
<222> Localização: (1)...(480)
<223> Outras informações: EPy7-cIL-7

<400> Seqüência: 6

atg ggt gtt cat gaa tgt cct gct tgg ttg tgg ttg ttg ttg tct ttg 48

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

```
ttg tct ttg gtt ctg ttg cct gta gcc tct gat tgt gat att gaa ggc       96
Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly
            20                  25                  30

aaa gac ggc aga gag tat cag cac gtt cta atg atc agc atc aat gac      144
Lys Asp Gly Arg Glu Tyr Gln His Val Leu Met Ile Ser Ile Asn Asp
        35                  40                  45

ttg gac atc atg ata aaa aat cgt acc aat tgc tcg aat aat gaa cct      192
Leu Asp Ile Met Ile Lys Asn Arg Thr Asn Cys Ser Asn Asn Glu Pro
    50                  55                  60

aac att tta aaa aaa cat gca tgt gat gat aat aag gaa ggt atg ttt      240
Asn Ile Leu Lys Lys His Ala Cys Asp Asp Asn Lys Glu Gly Met Phe
65                  70                  75                  80

tta tat cgt gct gct cac aag ttg aag caa ttt gtt aaa gtg aat aac      288
Leu Tyr Arg Ala Ala His Lys Leu Lys Gln Phe Val Lys Val Asn Asn
                85                  90                  95

agt gag gat ttc aat ctc cac tta tca aga gtt tca cag ggc aca tta      336
Ser Glu Asp Phe Asn Leu His Leu Ser Arg Val Ser Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

caa ttg ttg aac tgt act ccc aag gaa gac aat aaa tct tta aag gaa      384
Gln Leu Leu Asn Cys Thr Pro Lys Glu Asp Asn Lys Ser Leu Lys Glu
        115                 120                 125

cag aga aaa cag aag agc ttg tgt tcc cta ggg ata cta cta caa aag      432
Gln Arg Lys Gln Lys Ser Leu Cys Ser Leu Gly Ile Leu Leu Gln Lys
    130                 135                 140

ata aaa act tgt tgg aac aaa att ttg agg ggc tct aaa gaa cat tga      480
Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Arg Gly Ser Lys Glu His
145                 150                 155
```

<210> SEQ ID NO.: 7
<211> Comprimento: 159
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Canino

<400> Seqüência: 7

```
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1               5                   10                  15

Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly
            20                  25                  30

Lys Asp Gly Arg Glu Tyr Gln His Val Leu Met Ile Ser Ile Asn Asp
        35                  40                  45

Leu Asp Ile Met Ile Lys Asn Arg Thr Asn Cys Ser Asn Asn Glu Pro
    50                  55                  60
```

Asn Ile Leu Lys Lys His Ala Cys Asp Asp Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Ala Ala His Lys Leu Lys Gln Phe Val Lys Val Asn Asn
85 90 95

Ser Glu Asp Phe Asn Leu His Leu Ser Arg Val Ser Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Gln Leu Leu Asn Cys Thr Pro Lys Glu Asp Asn Lys Ser Leu Lys Glu
115 120 125

Gln Arg Lys Gln Lys Ser Leu Cys Ser Leu Gly Ile Leu Leu Gln Lys
130 135 140

Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Arg Gly Ser Lys Glu His
145 150 155

<210> SEQ ID NO.: 8
<211> Comprimento: 18
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Descrição da sequência artificial: Domínio mutado

<400> Seqüência: 8

ctgaataacg aaactaac 18

<210> SEQ ID NO.: 9
<211> Comprimento: 12
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Descrição da sequência artificial: Domínio mutado

<400> Seqüência: 9

aacttcacta ag 12

<210> SEQ ID NO.: 10
<211> Comprimento: 12
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Descrição da sequência artificial: Domínio mutado

<400> Seqüência: 10

gccaacggta cc 12

<210> SEQ ID NO.: 11
<211> Comprimento: 15
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Descrição da sequência artificial: Domínio mutado

<400> Seqüência: 11

ctgaacgaca gctgt 15

<210> SEQ ID NO.: 12
<211> Comprimento: 12
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Descrição da sequência artificial: Domínio mutado

<400> Seqüência: 12

atcttgaacg gg 12

<210> SEQ ID NO.: 13
<211> Comprimento: 25
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Seqüência: 13

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser
20 25

<210> SEQ ID NO.: 14
<211> Comprimento: 27
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Seqüência: 14

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly
20 25

<210> SEQ ID NO.: 15
<211> Comprimento: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Seqüência: 15

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
1 5 10 15

Gly

<210> SEQ ID NO.: 16
<211> Comprimento: 20
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Seqüência: 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> SEQ ID NO.: 17
<211> Comprimento: 19
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Seqüência: 17

Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Val
1 5 10 15

Ala Leu Ala

<210> SEQ ID NO.: 18
<211> Comprimento: 20
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Seqüência: 18

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Val Ala Leu Ala
20

<210> SEQ ID NO.: 19
<211> Comprimento: 26
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Descrição da sequência artificial: Peptídeo de sinal quimérico

<400> Seqüência: 19

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser
20 25

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada, de mamíferos, caracterizado pelo fato de que contém, pelo menos, três resíduos de aminoácidos N-glicosilados.

2. Composição de IL-7 hiperglicosilada, caracterizada pelo fato de que contém, pelo menos, 80% de polipeptídeos de IL-7 N-glicosilados em, pelo menos, três resíduos de aminoácidos diferentes.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que contém entre 80% e 95% de polipeptídeos de IL-7 N-glicosilados em, pelo menos, três resíduos de aminoácidos diferentes.

4. Composição de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizada pelo fato de que contém, pelo menos, 80% de polipeptídeos de IL-7 glicosilados em resíduos de aminoácidos diferentes, em número de três a oito, incluindo um sítio de O-glicosilação e até sete sítios de N-glicosilação.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que contém entre 80% e 95% de polipeptídeos de IL-7 glicosilados em resíduos de aminoácidos diferentes, em número de três a oito, incluindo um sítio de O-glicosilação e até sete sítios de N-glicosilação.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de IL-7 é de seres humanos.

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizada pelo fato de que os sítios de glicosilação são aqueles naturalmente presentes na sequência polipeptídica da IL-7 ou são criados artificialmente.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 7, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de IL-7 é de ser humano e em que os sítios de glicosilação são selecionados entre os resíduos de Asn das posições 70, 91 e 116, ou de Thr da posição 110, ou ainda de quaisquer dos sítios de glicosilação artificialmente criados listados na Tabela 1 e, preferencialmente, na Tabela 2, ou uma combinação deles.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 7, caracterizada pelo fato de que os referidos polipeptídeos de IL-7 contêm, ou são enriquecidos, em substituintes N-ligados selecionados entre:

a) uma cadeia de açúcares típica de mamíferos, preferencialmente do tipo expresso por células CHO;

b) uma cadeia de açúcares contendo uma cadeia complexa de N-carboidrato (por exemplo, uma estrutura biantenária ou triantenária), preferencialmente contendo muitas moléculas de manose e acetilglicosamina, bem como muitos resíduos terminais de ácido siálico;

c) uma cadeia de açúcar sialilada por alfa-2,6-sialiltransferase ou alfa-2,3-sialiltransferase; e/ou

d) uma cadeia de açúcar sialilada apresentando entre 3 e 30, preferencialmente, entre 7 e 23 grupos sialil-N-acetilgalactosamina.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que os referidos polipeptídeos contêm, ou são enriquecidos em, cadeias de carboidratos O-ligados, com um resíduo de ácido siálico terminal.

11. Composição de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que as cadeias de carboidratos contêm estruturas variando de tetrantenária a biantenária, com sialilação terminal completa ou parcial, preferencialmente uma estrutura triantenária e tri- ou bi-sialilação e/ou uma estrutura diantenária com di-sialilação.

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 11, caracterizada pelo fato de que os referidos polipeptídeos de IL-7 possuem ponto isoelétrico médio inferior a 6,5 e peso molecular aparente médio superior a 25kDA determinado por espectrometria de massas, ou peso molecular médio superior a 27kDa determinado por eletroforese em gel SDS.

13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 12, caracterizada pelo fato de que os referidos polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilada apresentam meia-vida e tempo de residência médio maiores, em mamíferos, *in vivo*.

14. Polipeptídeo de IL-7, caracterizado pelo fato de que possui uma seqüência modificada de aminoácidos, a qual é contém, pelo menos, um sítio de glicosilação artificialmente criado.

15. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que contém um, dois, três ou quatro sítios de glicosilação artificialmente criados, preferencialmente um, dois ou três e, particularmente, um 1 ou dois 2.

16. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que contém a seqüência de um polipeptídeo de IL-7 de seres humanos, o qual é caracterizado por possuir uma ou várias modificações nos

aminoácidos selecionadas entre Lys28Asn - Ile30Ser - Ile30Thr - Ile30Asn - Ser32Thr - Leu35Ser - Leu35Thr - Glu38Ser - Glu38Thr - Phe39Ser - Phe39Thr - Phe42Ser - Phe42Thr - Glu52Ser - Glu52Thr - Val82Asn - Glu84Thr - Glu84Ser - Lys97Asn - Arg99Thr - Arg99Ser - Ala102Asn - Leu104Thr - Leu104Ser - Leu104Asn - Glu106Thr - Glu106Ser - Leu128Ser - Leu128Thr - Ile145Asn - Met147Thr - Met147Ser - Met147Asn - Thr149Ser, ou um fragmento característico deles contendo, pelo menos, cinco resíduos de aminoácidos, tipicamente pelo menos 8, 9, 10, 11, 12 ou 15 resíduos.

17. Molécula de ácido nucléico, caracterizada pelo fdato de que codifica o polipeptídeo de IL-7 como definido em qualquer uma das reivindicações 14 e 15.

18. Molécula de ácido nucléico, caracterizada pelo fato de que codifica um polipeptídeo contendo a SEQ ID NO: 19.

19. Molécula de ácido nucléico, caracterizada pelo fato de que contém a SEQ ID NO: 2 ou 4, ou uma fita complementar delas.

20. Molécula de ácido nucléico, caracterizada pelo fato de que possui a seqüência de SEQ ID NO: 6.

21. Vetor, caracterizado pelo fato de que contém a molécula de ácido nucléico como definida em qualquer uma das reivindicações 17 a 20.

22. Célula hospedeira ou hospedeira recombinante, caracterizada pelo fato de que possui o vetor como definido na reivindicação 21.

23. Célula hospedeira ou hospedeira recombinante de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que expressa ou superexpressa, naturalmente ou após transgênese, um gene de glicosiltransferase e/ou sialiltransferase apropriado, preferencialmente um gene α-2-6-sialiltransferase.

24. Método de produção do polipeptídeo de IL-7 como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) cultivar uma célula hospedeira recombinante, possuindo uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifica um polipeptídeo de IL-7; e

b) isolar o polipeptídeo de IL-7 produzido por esta célula;

em que a cultura é feita em modo de batelada ou de perfusão, permitindo a produção de um polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada.

25. Fármaco, caracterizado pelo fato de que contém a composição de polipeptídeo de IL-7 como definida em

qualquer uma das reivindicações 2 a 16, em que o fármaco contém menos de cerca de 10% de um polipeptídeo de IL-7 monoglicosilada ou não-glicosilada e/ou essencialmente isenta de impurezas relacionadas com o produto.

26. Anticorpo, bem como fragmentos ou derivados dele, caracterizado pelo fato de que é especificamente imunoreativo a um polipeptídeo de IL-7 como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16.

27. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que contém o anticorpo como definido na reivindicação 26.

28. Uso do anticorpo como definido na reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento que trata desordens linfoproliferativas ou doenças auto-imunes em mamíferos.

29. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que contém uma quantidade eficaz do fármaco como definido na reivindicação 25, e um ou mais veículos ou excipientes farmaceuticamente compatíveis.

30. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a composição é administrada três vezes por semana, duas vezes por semana, uma vez por semana, uma vez em semanas alternadas, uma vez por mês, uma ou duas vezes antes de vacinação, ou antes e após vacinação.

31. Uso da composição de polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada como definida em qualquer uma das reivindicações 2 a 13, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento que provoca ou modula uma resposta imune no indivíduo.

32. Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o medicamento se destina a induzir a estimulação de linfopoiese prolongada e/ou amplificar uma resposta imune.

33. Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o medicamento se destina ao tratamento de uma infecção viral, como a infecção por HIV, hepatite viral, febre do Nilo ocidental, dengue.

34. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada deve ser administrado em associação com uma molécula de interferon.

35. Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o medicamento se destina a melhorar a recuperação timopoiética em indivíduos com o sistema imune comprometido.

36. Uso de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada

deve ser administrado em associação com um fator de crescimento de queratinócitos, um fator de célula-tronco, um antagonista da gonadoestimulina ou com um hormônio de crescimento.

37. Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada deve ser administrado em associação com um antígeno, ou mistura de antígenos a fim de fornecer imunização terapêutica contra células malignas, vírus ou bactéria.

38. Uso de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de IL-7 hiperglicosilada deve ser administrado em associação com GM-CSF.

FIG. 1

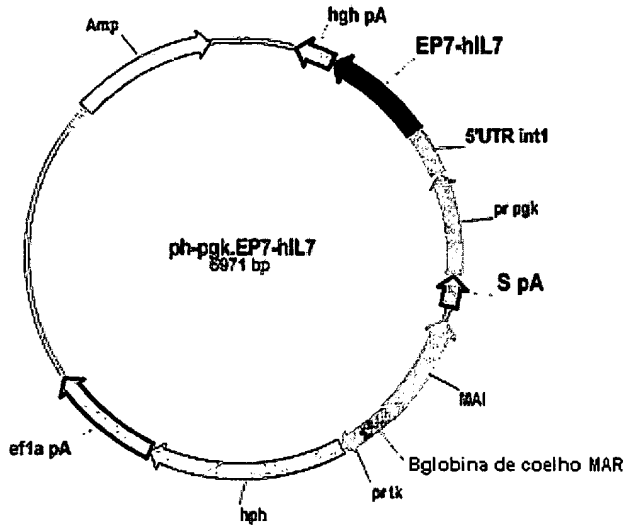

Amp
hgh pA
EP7-hIL7
5'UTR int1
pr pgk
S pA
fdAI
Bglobina de coelho MAR
pr tk
hph
ef1a pA
ph-pgk.EP7-hIL7
5971 bp

FIG. 2

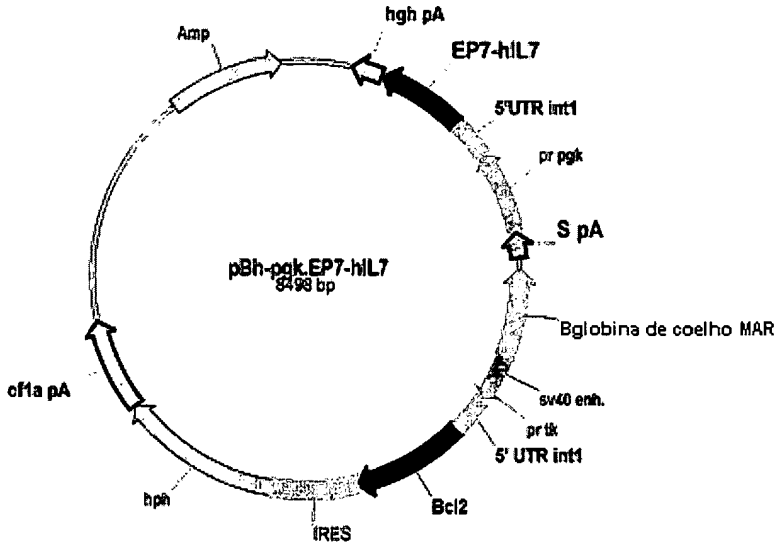

Amp
hgh pA
EP7-hIL7
5'UTR int1
pr pgk
S pA
Bglobina de coelho MAR
sv40 enh.
pr tk
5' UTR int1
Bcl2
IRES
hph
cf1a pA
pBh-pgk.EP7-hIL7
8498 bp

FIG. 3

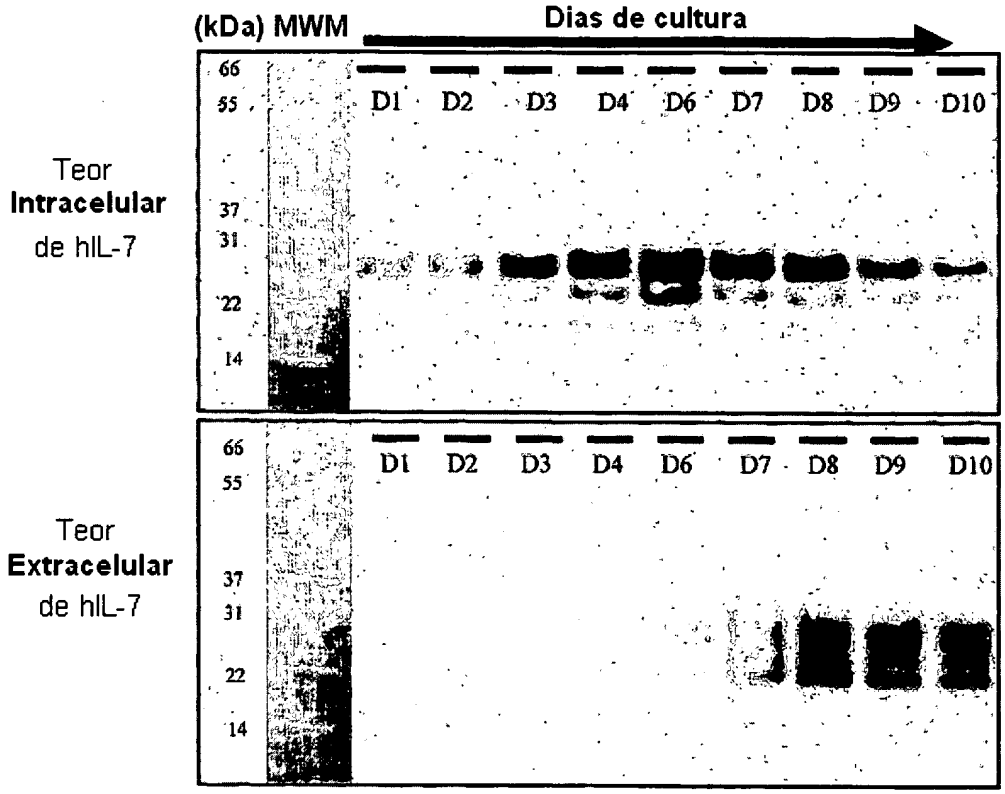

(kDa) MWM
Dias de cultura
66
55
37
31
22
14
D1
D2
D3
D4
D6
D7
D8
D9
D10
Teor
Intracelular
de hIL-7
Teor
Extracelular
de hIL-7

FIG. 4

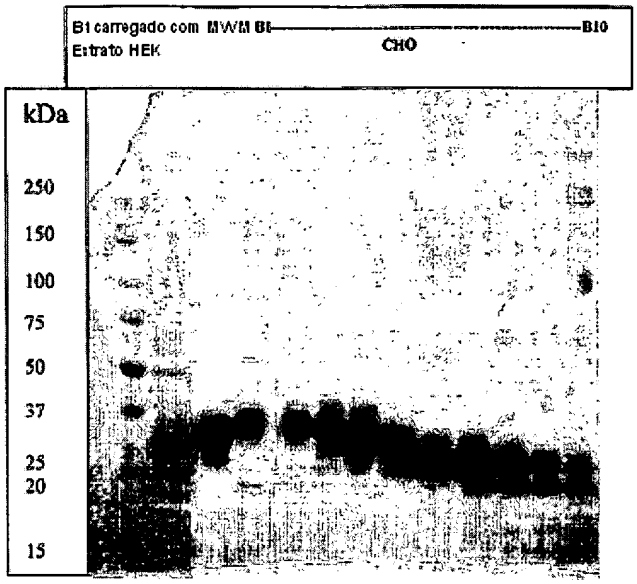

B1 carregado com MWM B1
B10
Extrato HEK
CHO
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15

FIG. 5

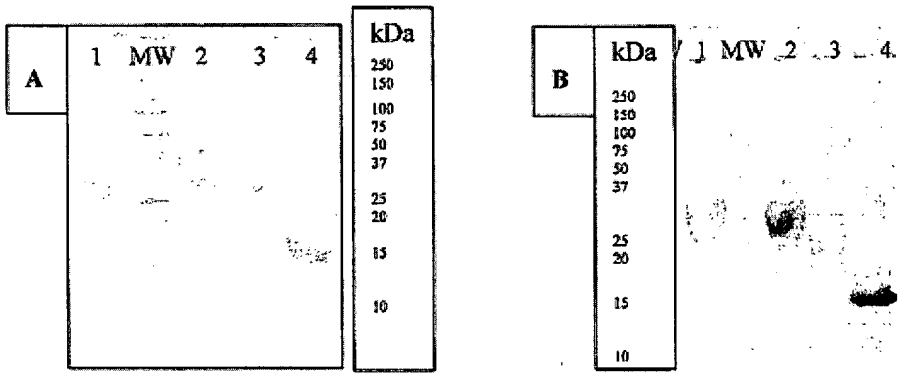

A
1 MW 2 3 4
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
B
kDa
1 MW 2 3 4
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

FIG. 6

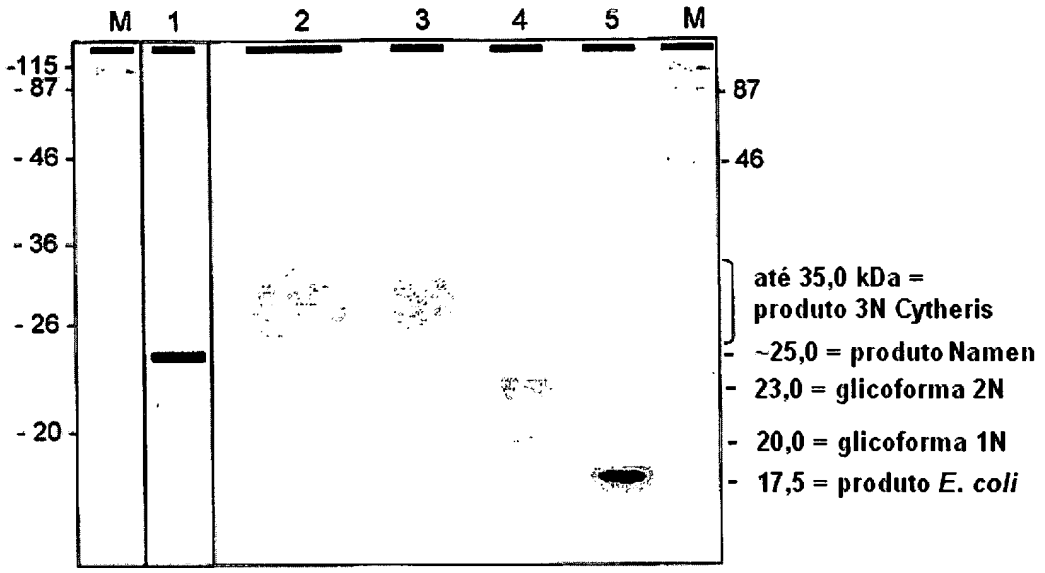

M
1
2
3
4
5
M
-115
- 87
- 46
- 36
- 26
- 20
- 87
- 46
até 35,0 kDa =
produto 3N Cytheris
~25,0 = produto Namen
23,0 = glicoforma 2N
20,0 = glicoforma 1N
17,5 = produto E. coli

FIG. 7

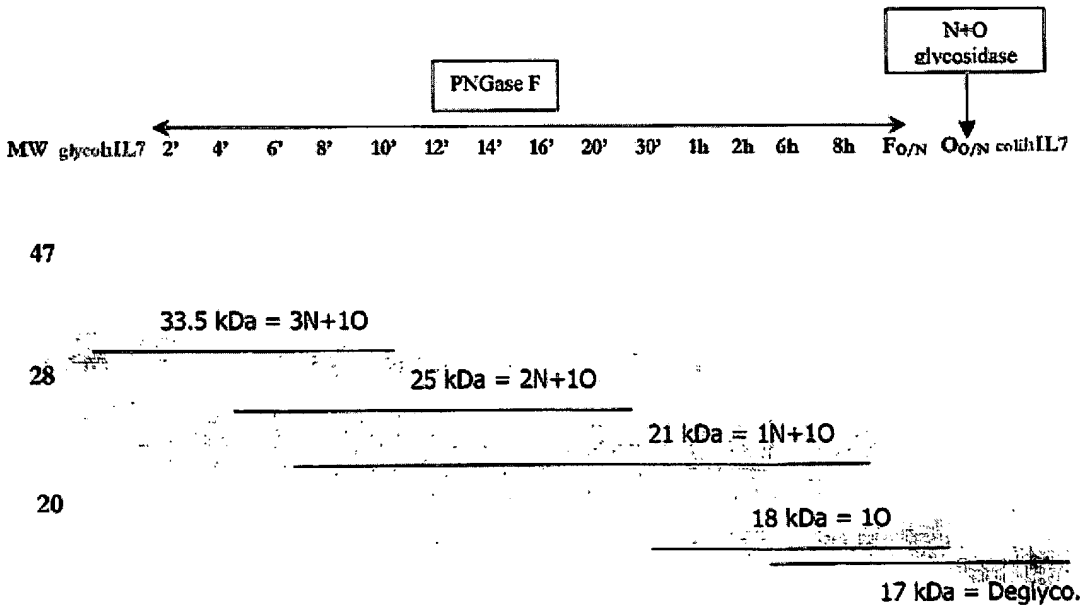

N+O
glycosidase
PNGase F
MW glycohIL7
2'
4'
6'
8'
10'
12'
14'
16'
20'
30'
1h
2h
6h
8h
Fo/N
Oo/N colihIL7
47
33.5 kDa = 3N+1O
28
25 kDa = 2N+1O
21 kDa = 1N+1O
20
18 kDa = 1O
17 kDa = Deglyco.

FIG. 8

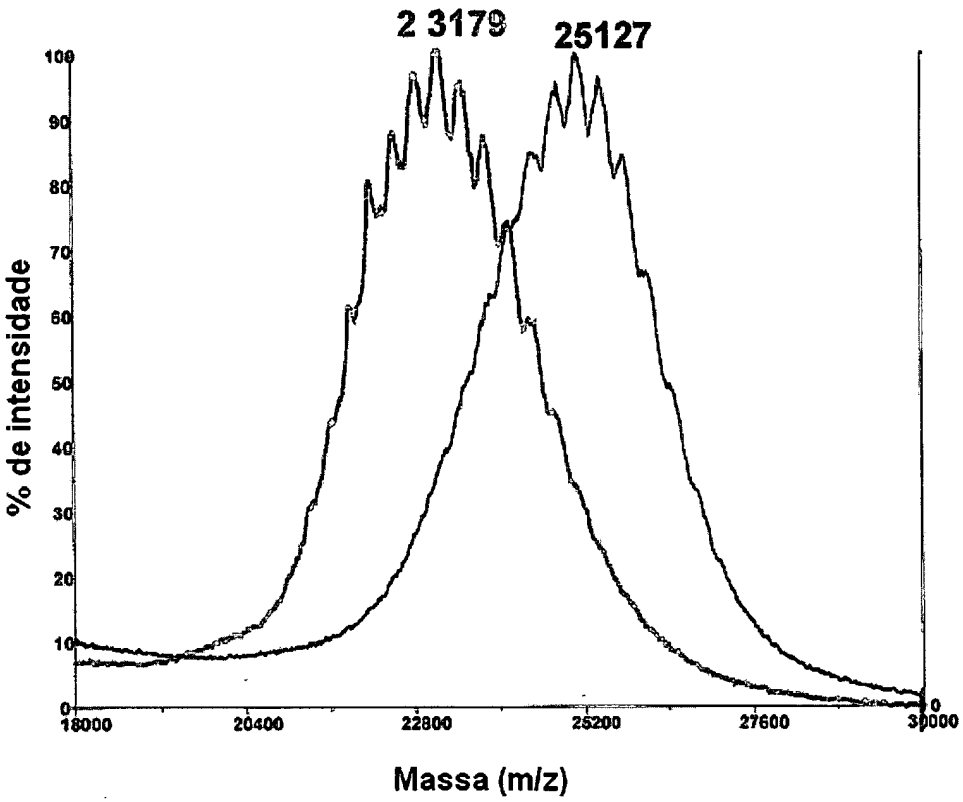

2 3179
25127
% de intensidade
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
18000
20400
22800
25200
27600
30000
Massa (m/z)

FIG. 9

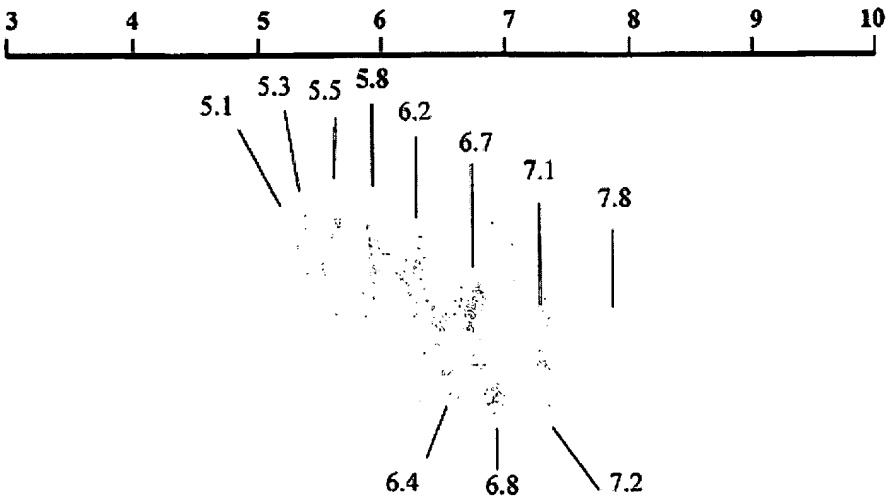


FIG. 10

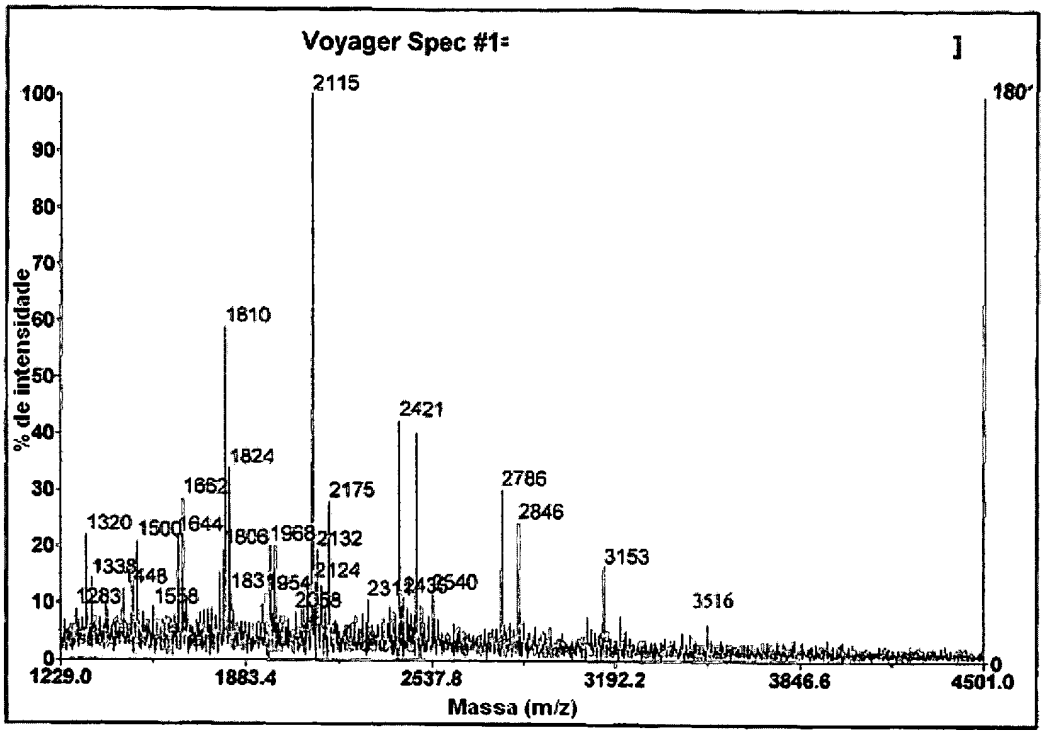

Voyager Spec #1=
% de intensidade
Massa (m/z)
2115
1810
2421
1824
2786
2846
2175
1662
1320
1500
1644
1968
2132
3153
2124
3516
1338
1448
1558
1831
1954
2540
1283
1229.0
1883.4
2537.8
3192.2
3846.6
4501.0

FIG. 11

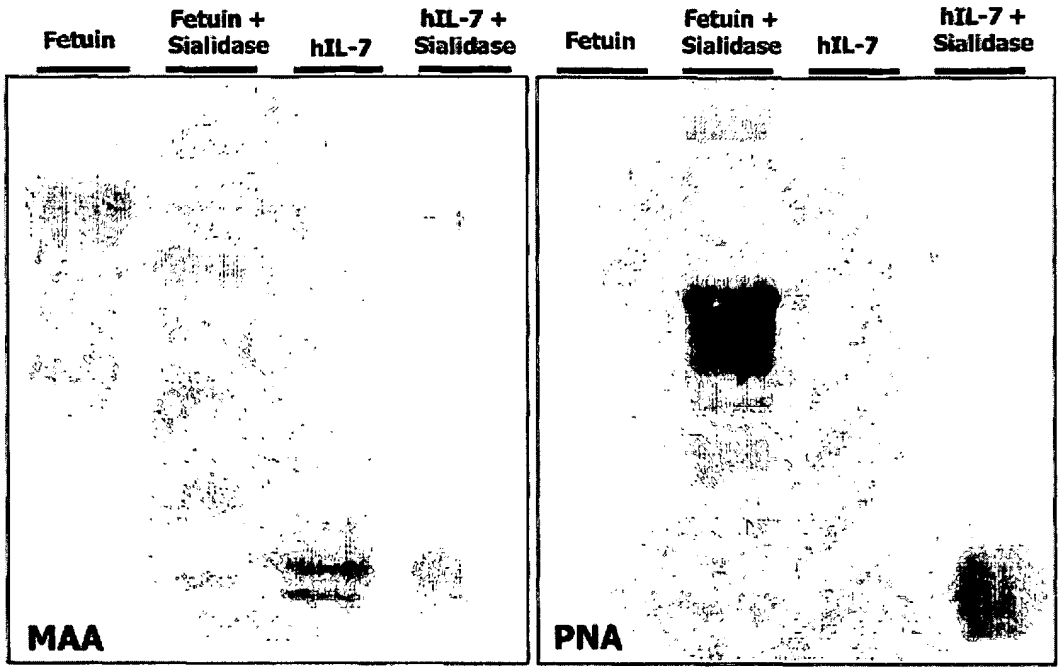

Fetuin
Fetuin + Sialidase
hIL-7
hIL-7 + Sialidase
MAA
Fetuin
Fetuin + Sialidase
hIL-7
hIL-7 + Sialidase
PNA

FIG. 12

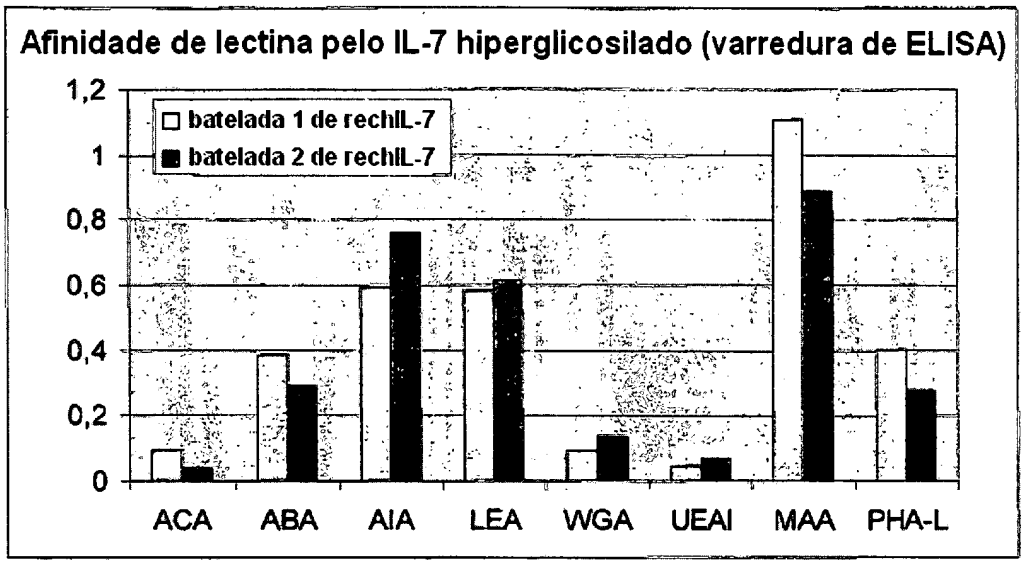

Afinidade de lectina pelo IL-7 hiperglicosilado (varredura de ELISA)
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
batelada 1 de rechIL-7
batelada 2 de rechIL-7
ACA
ABA
AIA
LEA
WGA
UEAI
MAA
PHA-L

FIG. 13

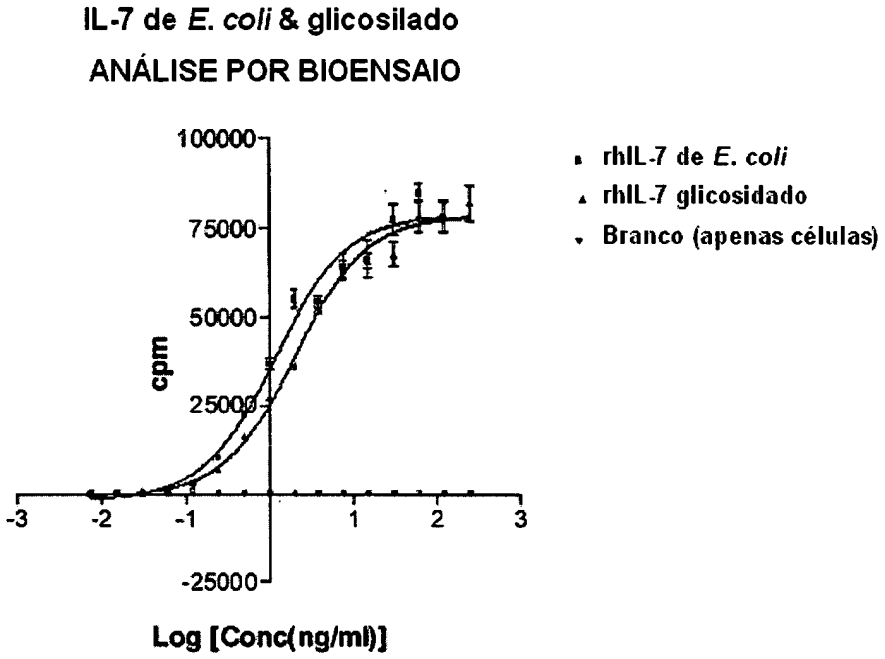
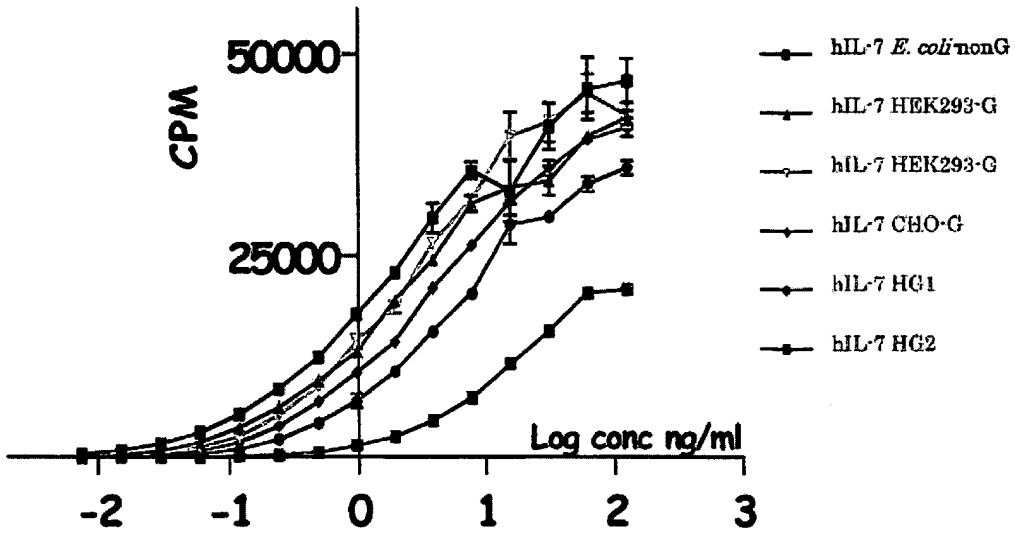

IL-7 de E. coli & glicosilado
ANÁLISE POR BIOENSAIO
100000
75000
50000
25000
-25000
cpm
-3
-2
-1
1
2
3
Log [Conc(ng/ml)]
rhIL-7 de E. coli
rhIL-7 glicosidado
Branco (apenas células)

FIG. 14


50000
25000
CPM
Log conc ng/ml
-2
-1
0
1
2
3
hIL-7 E. coli nonG
hIL-7 HEK293-G
hIL-7 HEK293-G
hIL-7 CHO-G
hIL-7 HG1
hIL-7 HG2

PI 0613747-4

RESUMO

POLIPEPTÍDEOS DE IL-7 GLICOSILADA, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E USOS

A presente invenção se refere a polipetídeos de interleucina-7, novos e melhorados, bem como de suas composições, suas preparações e seus usos. A invenção se refere, mais particularmente, a polipeptídeos de IL-7 hiperglicosilada com propriedades melhoradas, bem como sua fabricação e seus usos terapêuticos. A invenção apresenta também novos polipeptídeos de IL-7 com seqüências modificadas de aminoácidos, contendo sítios de glicosilação criados artificialmente, bem como moléculas de ácidos nucléicos, vetores e células hospedeiras recombinantes correspondentes. A invenção também se refere ao uso desses polipeptídeos, células ou ácidos nucléicos para tratamento curativo ou preventivo de mamíferos, incluindo seres humanos.