

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2002.08.23**

(30) Prioridade(s): **2001.08.24 US 314613 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.08.31**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.05.23**
160/2012

(73) Titular(es):

UVIC INDUSTRY PARTNERSHIPS INC.
BOX 3075 R-HUT MCKENZIE AVENUE
VICTORIA, BRITISH COLUMBIA V8W 3W2 CA
JOHNS HOPKINS UNIVERSITY US

(72) Inventor(es):

SAMUEL R. DENMEADE US
JOHN T. ISAACS US
JAMES THOMAS BUCKLEY CA

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROAEROLISINA CONTENDO SEQUÊNCIA DE ACTIVAÇÃO DE PROTEASES E MÉTODOS DE USO PARA O TRATAMENTO DO CANCRO DA PRÓSTATA**

(57) Resumo:

O PRESENTE DOCUMENTO DIVULGA PÉPTIDOS DE PROAEROLISINA (PA) MODIFICADA. EM ALGUNS EXEMPLOS, AS PROTEÍNAS INCLUEM UM LOCAL DE CLIVAGEM DE PROTEASE ESPECÍFICA DA PRÓSTATA E PODEM INCLUIR ADICIONALMENTE UM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO ESPECÍFICO DO TECIDO PROSTÁTICO QUE SUBSTITUI FUNCIONALMENTE O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DA PA ORIGINAL. NOUTROS EXEMPLOS, AS PROTEÍNAS INCLUEM UM LOCAL DE CLIVAGEM DE FURINA E UM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO ESPECÍFICO DO TECIDO PROSTÁTICO QUE SUBSTITUI FUNCIONALMENTE O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DA PA ORIGINAL. SÃO IGUALMENTE DIVULGADOS MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DE TAIS PÉPTIDOS PARA TRATAMENTO DO CANCRO DA PRÓSTATA.

RESUMO

PROAEROLISINA CONTENDO SEQUÊNCIA DE ACTIVAÇÃO DE PROTEASES E MÉTODOS DE USO PARA O TRATAMENTO DO CANCRO DA PRÓSTATA

O presente documento divulga péptidos de proaerolisina (PA) modificada. Em alguns exemplos, as proteínas incluem um local de clivagem de protease específica da próstata e podem incluir adicionalmente um domínio de ligação específico do tecido prostático que substitui funcionalmente o domínio de ligação da PA original. Noutros exemplos, as proteínas incluem um local de clivagem de furina e um domínio de ligação específico do tecido prostático que substitui funcionalmente o domínio de ligação da PA original. São igualmente divulgados métodos de utilização de tais péptidos para tratamento do cancro da próstata.

DESCRIÇÃO

PROAEROLISINA CONTENDO SEQUÊNCIA DE ACTIVAÇÃO DE PROTEASES E MÉTODOS DE USO PARA O TRATAMENTO DO CANCRO DA PRÓSTATA

OBJECTO

Este pedido está relacionado com novas variantes da proteína proaerolisina (PA) e métodos para a sua utilização no tratamento do cancro da próstata metastático e localizado.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Um em cada três cancros diagnosticados em homens americanos é de origem prostática, o que faz com que o cancro da próstata seja o tumor mais frequentemente diagnosticado em homens nos Estados Unidos (Berges *et al. Clin. Cancer Res.* 1:473-480, 1995). A incidência do cancro da próstata nos EUA não tem diminuído com as alterações no estilo de vida; na realidade, a taxa de incidência do cancro da próstata clínico tem registado um aumento regular desde a década de 1930 (Pinski *et al. Cancer Res.* 61:6372-6,2001). A incidência do cancro da próstata aumenta com a idade mais rapidamente do que qualquer outro tipo de cancro; menos de 1% dos cancros da próstata são diagnosticados em homens com menos de 50 anos de idade (Furuya *et al. Cancer Res.* 54:6167-75, 1994). Assim, como a esperança de vida da população masculina aumenta ao longo do tempo, a incidência do cancro da próstata clínico aumentará igualmente (Furuya *et al. Cancer Res.* 54:6167-75, 1994).

Actualmente, não existe qualquer tratamento que prolongue significativamente a sobrevivência dos homens com cancro da próstata metastático (Khan and Denmeade, *Prostate* 45:80-83, 2000). A castração médica com estrogénio oral (ablação androgénica) constituiu a primeira terapia sistémica efectiva para o cancro, e continua a ser a terapia genericamente mais

útil contra o cancro da próstata. Embora a terapia da ablação androgénica tenha um benefício paliativo substancial, o seu impacto sobre a sobrevivência global é reduzido (Berges *et al. Clin. Cancer Res.* 1:473-480, 1995). Esta terapia acaba por fracassar porque o cancro da próstata metastático num doente individual possui uma composição heterogénea de células cancerígenas dependentes do androgénio e independentes do androgénio (Christensen *et al. Bioorg. Medicinal Chem.* 7:1273-80, 1999). Na sequência da ablação androgénica, as células dependentes do androgénio nestes tumores deixam de proliferar e activam uma via de suicídio celular denominada morte celular programada (PCD de "programmed cell death") ou apoptose. Devido à eliminação deste subgrupo de células dependentes do androgénio, a maioria dos homens com cancros da próstata metastáticos apresenta uma resposta benéfica à terapia de carência de androgénio. Contudo, todos os doentes acabam por recair numa condição que deixa de responder a qualquer terapia adicional antiandrogénio, por mais completa que esta seja, devido à presença de células prostáticas cancerígenas independentes do androgénio dentro dos sítios metastáticos. Infelizmente, nesta fase a doença é uniformemente fatal porque não há hoje uma terapia que seja eficaz na eliminação das células prostáticas cancerígenas independentes do androgénio (Khan and Denmeade, *Prostate* 45:80-83, 2000).

Têm sido propostas várias abordagens alternativas ao tratamento do cancro da próstata. Uma consistiu em desenvolver métodos para o rastreio agressivo da doença localmente enquanto esta ainda se encontra na próstata sendo, assim, potencialmente tratável por uma terapia local definitiva. Os cancros localizados apresentam muitas vezes uma diferenciação moderada e menor volume. Ao longo das últimas décadas, registaram-se melhoramentos na gestão cirúrgica e radioterapêutica de cancros da próstata localizados. Estes melhoramentos culminaram nos últimos anos na redução da taxa

de mortalidade do cancro da próstata, pela primeira vez em cinquenta anos.

Todavia, embora este progresso tenha aumentado a taxa de cura, continua a haver um elevado número de homens que não são curados por terapias locais e que acabam por morrer da doença metastática. Esta realidade clínica conduziu ao desenvolvimento de tratamentos não hormonais para o cancro da próstata metastático. Os agentes quimioterapêuticos anti-proliferativos normais não têm tido sucesso no tratamento do cancro da próstata. Este tipo de agente pode ser ineficaz contra os cancros prostáticos independentes do androgénio porque estes cancros apresentam uma taxa de proliferação extremamente baixa em comparação com outros tipos de tumores e muitos tecidos normais como cutâneos, do tracto gastrointestinal e da medula óssea. A título de exemplo, a fracção de crescimento em 117 sítios metastáticos de cancro da próstata obtidos de 11 doentes que falharam a ablação de androgénio em autópsia "a quente" foi de $7,1 \pm 0,8\%$. (Pinski *et al.* *Cancer Res.* 61:6372-6, 2001). Esta baixa taxa proliferativa pode explicar a relativa falta de resposta das células prostáticas cancerígenas em humanos à quimioterapia antiproliferativa normal, enquanto as linhagens de células prostáticas cancerígenas independentes do androgénio e altamente proliferativas continuam extraordinariamente sensíveis à indução da PCD *in vitro*.

Várias estratégias foram propostas para o tratamento de cancros da próstata de proliferação lenta. Uma abordagem consiste em identificar vias de sinalização específicas para as quais as células prostáticas cancerígenas, no decurso da transformação maligna, adquirem uma dependência única para sobrevivência. Uma vez identificadas, é possível desenvolver pequenas moléculas ou inibidores biológicos destas vias como terapia. Um exemplo desta abordagem consiste no uso de pequenas moléculas ou inibidores de anticorpos monoclonais das

vias do Her2/neu ou do receptor EGF. Um outro método é inibir uma proteína intracelular omnipresente cuja função é obrigatória para a sobrevivência de todos os tipos de células. Esta abordagem permitiria ultrapassar o problema da heterogeneidade e "resistência" já que todas as células cancerígenas no interior de um tumor podiam ser mortas recorrendo a esta abordagem. Contudo, a citotoxicidade não seria específica por tipo de célula e a administração de uma tal toxina genérica estaria associada a uma toxicidade sistémica significativa. Por conseguinte, é necessário dispor de um método para direccionar as citotoxinas directamente para os sítios do cancro prostático.

Uma outra estratégia para o tratamento de cancros da próstata de proliferação lenta consiste em administrar citotoxinas que matam células não através da indução de apoptose subsequente à inibição de vias metabólicas ou de sinalização críticas mas sim através de citólise não específica por via da ruptura da membrana plasmática. Foram descritas inúmeras toxinas citolíticas (Lesieur *et al.* *Mol. Membr. Biol.* 14:45064, 1997). Estas toxinas citolíticas são frequentemente de origem bacteriana e são, em geral, proteínas de folha beta que oligomerizam na membrana plasmática para produzirem poros bem caracterizados que, uma vez formados, conduzem à morte rápida da célula citolítica (Rossjohn *et al.* *J. Struct. Biol.* 121:92-100,1998). Estas toxinas apresentam também uma capacidade não específica de matar células, pelo que não podem ser administradas como terapia sem uma toxicidade significativa. Assim sendo, existe uma necessidade de dispor de agentes para o tratamento do cancro da próstata, que sejam predominantemente citotóxicos para as células prostáticas cancerígenas

RESUMO

A invenção encontra-se definida nas reivindicações. São divulgadas no presente documento variantes da molécula de proaerolisina (PA) e métodos para a sua utilização no tratamento de cancros da próstata metastáticos e localizados, tais como cancros da próstata de proliferação lenta.

Num exemplo, uma variante da molécula de PA inclui um local de clivagem da protease específica da próstata, tal como um local de clivagem específico do antigénio específico da próstata (PSA de "prostate-specific antigen"), do antigénio específico da membrana da próstata (PSMA de "prostate specific membrane antigen"), ou da calicreína glandular humana 2 (HK2), que substitui funcionalmente o local de clivagem original da furina PA. Deste modo, a administração das variantes divulgadas da molécula de PA a um sujeito com cancro da próstata resulta na activação das variantes divulgadas da molécula de PA na presença da protease específica da próstata, e a lise de células tais como células prostáticas cancerígenas. Em alguns exemplos, as variantes da molécula de PA incluem igualmente um domínio de ligação específico do tecido prostático, para reforçar a abordagem selectiva às células cancerígenas.

Num outro exemplo, uma variante da molécula de PA inclui um local de clivagem de furina, e um domínio de ligação específico do tecido prostático que substitui funcionalmente o domínio de ligação original PA, para apoiar na abordagem selectiva às células prostáticas cancerígenas.

São divulgados métodos para o tratamento de cancros da próstata metastáticos e localizados usando as variantes divulgadas da molécula de PA. São adicionalmente divulgados métodos para estimular o sistema imunitário de um sujeito no

sentido de melhorar o tratamento do cancro da próstata metastático e localizado.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **Fig. 1** é uma representação esquemática de domínios da proaerolisina (não desenhados à escala) e mostra o resultado da activação pela furina.

A **Fig. 2** é um gráfico de barras que mostra os resultados de um ensaio de hemólise em que a PSA-PA 1 é pré-incubada com plasma humano ou plasma humano reforçado com PSA enzimaticamente activo (10.000 ng/ml).

A **Fig. 3** é um gráfico que compara a toxicidade *in vitro* de diversas variantes de proaerolisina que incluem um local de clivagem de PSA no lugar do local original da furina, com proaerolisina de tipo selvagem.

A **Fig. 4** é um gráfico de barras que compara a especificidade da PSA-PA1 em tumores produtores de PSA (LNCaP), e não produtores de PSA (SN12C), *in vivo*.

As **Figs. 5A-5M** são desenhos esquemáticos (não à escala) que mostram como é que uma sequência de proaerolisina pode ser alterada para dar origem a inúmeras variantes da molécula de PA diferentes. O símbolo "*" representa uma ou mais mutações pontuais, e/ou uma ou mais deleções que diminuem a função do domínio de ligação PA (ou seja, a capacidade para se concentrar numa membrana celular)

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

As sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos que constam da listagem de sequências anexa são apresentadas usando as abreviaturas normais para as bases de nucleótidos, e um código de três letras para os aminoácidos. É apresentada apenas uma cadeia da sequência de cada ácido nucleico, mas a

cadeia complementar é entendida como abrangida por qualquer referência à cadeia visualizada.

SEQ N° ID: 1 e 2 representam um cDNA e uma sequência de proteína de proaerolisina de tipo selvagem, respectivamente.

SEQ N° ID: 3 e 4 representam a sequência de PSA-PA1 cDNA e proteína, respectivamente, na qual o local de furina da proaerolisina foi substituído por um local de clivagem de PSA.

SEQ N° ID: 5 e 15-21 são locais de clivagem de PSA detectada nas proteínas humanas semenogelina I e II.

SEQ N° ID: 6 e 7 representam a sequência de PSA-IK cDNA e proteína, respectivamente, na qual o local de furina da proaerolisina foi substituído por um local de clivagem de PSA.

SEQ N° ID: 8, 11, e 14-21 são locais de clivagem de PSA alternativos.

SEQ N° ID: 9 e 10 representam a sequência de PSA-PA2 cDNA e proteína, respectivamente, na qual o local de furina da proaerolisina foi substituído por um local de clivagem de PSA.

SEQ N° ID: 12 e 13 representam a sequência de PSA-PA3 cDNA e proteína, respectivamente, na qual o local de furina da proaerolisina foi substituído por um local de clivagem de PSA.

SEQ N° ID: 22 é uma sequência original de proteínas da hormona libertadora de hormona luteinizante (LHRH).

SEQ N° ID: 23 é uma sequência de proteínas da LHRH modificada.

SEQ N° ID: 24 é uma sequência de proteínas de uma variante de péptido de PA, na qual o local de furina da PA foi substituído por um local de clivagem de PSA, e na qual o domínio de ligação original da PA é suprimido e substituído por uma SEQ N° ID: 23.

SEQ N° ID: 25 é uma sequência de proteínas de uma variante de péptido de PA, na qual o local da furina de PA é conservado, e o domínio de ligação original de PA foi suprimido e substituído por uma SEQ N° ID: 23.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE VÁRIAS CONFIGURAÇÕES

Termos e Abreviaturas

As explicações que se seguem de termos e métodos são apresentadas para melhor descrição da presente divulgação e para orientar os técnicos da especialidade na prática da presente divulgação. Tal como usadas no presente texto e nas reivindicações anexas, as formas do singular "um/uma" ou "o/a" incluem as referências ao plural, salvo indicação claramente em contrário resultante do contexto. A título de exemplo, a referência a "uma variante de molécula de PA" inclui uma pluralidade de tais moléculas e a referência a "anticorpo" inclui referência a um ou mais anticorpos e equivalentes do mesmo e conhecidos dos técnicos da especialidade, e assim sucessivamente. Salvo explicação em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados no presente possuem o mesmo significado que lhes é normalmente atribuído pelos técnicos da especialidade a quem a presente divulgação se destina.

Aerolisina: toxina formadora de canais produzida como uma protoxina inactiva denominada proaerolisina (PA) (a PA de tipo selvagem é apresentada na SEQ N° ID: 1 e 2). A proteína PA contém inúmeras funcionalidades discretas que incluem um domínio de ligação, aminoácidos 1-83 de uma SEQ N° ID: 2), um domínio de toxina de aminoácidos 84-426 de uma SEQ N° ID: 2), e um domínio de péptido inibidor de terminal C- aminoácidos 427-470 da uma SEQ N° ID: 2) que contém um local de activação de protease (aminoácidos 427-432 de uma SEQ N° ID: 2).

O domínio de ligação reconhece e liga-se a âncoras membranares de glicofosfaridilinositol (GPI), como as que se encontram em Thy-1 nos linfócitos T, o produto genético PIGA

encontrado na membrana de eritrócitos e no antigénio de células estaminais da próstata (PSCA de "Prostate Stem Cell Antigen"). A maior parte das células dos mamíferos exprimem proteínas ancoradas de GPI nas respectivas superfícies. O local de activação ou proteólise na proaerolisina é uma sequência de seis aminoácidos que é reconhecida como um substrato proteolítico pelas proteases da família da furina. A PA é activada por hidrólise de um segmento inibidor de terminal C- pela furina (FIG. 1). A aerolisina activada liga-se a proteínas ancoradas de GPI na membrana celular e forma um heptâmero que se introduz na membrana para produzir canais bem definidos de ~ 17 Å. A formação de canais conduz à rápida morte das células por via de necrose. A aerolisina de tipo selvagem é tóxica para as células dos mamíferos, incluindo eritrócitos, a, por exemplo, 1 nanomolar ou menos.

Animal: organismos vertebrados multicelulares vivos, uma categoria que inclui, por exemplo, mamíferos e aves.

Anticorpo: moléculas de imunoglobulina e fracções imunologicamente activas de moléculas de imunoglobulina, ou seja, moléculas que contêm um local de ligação a um antigénio que se liga especificamente (imunoreage com) um antigénio.

Um anticorpo que ocorre naturalmente (por exemplo, IgG) inclui quatro cadeias de polipéptidos, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves, (L) interligadas por ligações dissulfureto. Contudo, a função de ligação de um anticorpo ao antigénio pode ser desempenhada por fragmentos de um anticorpo de ocorrência natural. Assim, estes fragmentos de ligação ao antigénio são igualmente designados pelo termo anticorpo. Exemplos de fragmentos ligantes abrangidos pelo termo anticorpo incluem (i) um fragmento Fab constituído pelos domínios VL, VH, CL e CHI; (ii) um fragmento Fd constituído pelos domínios VH e CHI; (iii) um fragmento Fv constituído pelos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (iv) um fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-6, 1989)

constituído por um domínio VH; (v) uma região isolada determinante da complementaridade (CDR de "complementarity determining region"); e (vi) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfureto na região charneira. Adicionalmente, embora os dois domínios do fragmento Fv estejam codificados por genes separados, é possível criar um ligante sintético que lhes permite apresentarem-se como uma cadeia proteica única (conhecida como cadeia singular Fv (scFv); Bird *et al.* *Science* 242:423-6, 1988; e Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-83, 1988) por métodos recombinantes. Tais anticorpos de cadeia singular estão também incluídos. Numa configuração, um anticorpo inclui anticorpos camelizados (ver, por exemplo, Tanha *et al.* *J. Biol. Chem.* 276:24774-80, 2001).

Num exemplo, os fragmentos de anticorpos são capazes de reticular) os respectivos antígenos alvo, por exemplo fragmentos bivalentes tais como fragmentos F(ab')₂. Em alternativa, um fragmento de anticorpo que não reticule o respectivo antígeno alvo (por exemplo, um fragmento Fab) pode ser usado em conjunto com um anticorpo secundário que sirva para reticular o fragmento de anticorpo, reticulando deste modo o antígeno alvo. Os anticorpos podem ser fragmentados usando técnicas convencionais e a utilidade dos fragmentos rastreada de maneira igual à descrita para anticorpos inteiros. Um anticorpo está ainda destinado a incluir moléculas bi-específicas e quiméricas que ligam especificamente o antígeno alvo.

"Ligar especificamente" refere-se à capacidade dos anticorpos individualmente imunoreagirem especificamente com um antígeno. A ligação é uma reacção de ligação não aleatória entre uma molécula do anticorpo e um determinante antigénico da molécula da superfície da célula T. A especificidade ligante desejada é tipicamente determinada a partir do ponto

de referência da capacidade do anticorpo para ligar diferencialmente a molécula da superfície da célula T e um antígeno não associado, estabelecendo deste modo a distinção entre dois antígenos diferentes, particularmente quando os dois antígenos apresentam epítopos únicos. Um anticorpo que especificamente liga a um epítipo particular é referido como um "anticorpo específico".

Cancro: neoplasma maligno que passou por uma anaplasia característica com perda de diferenciação, aumento na velocidade de crescimento, invasão do tecido circundante, e capaz de metastizar.

cDNA (DNA complementar): porção de DNA à qual faltam segmentos internos não codificantes (intrões) e sequências reguladoras que determinam a transcrição. É possível sintetizar cDNA em laboratório por transcrição reversa a partir de RNA mensageiro extraído das células.

Síntese química: meio artificial pelo qual é possível fazer uma proteína ou um peptídeo. Uma proteína ou um peptídeo sintético são os que são produzidos por um tal meio artificial.

Quimioterapia: no tratamento oncológico, quimioterapia refere-se à administração de um composto, ou combinação de compostos, para matar células de reprodução rápida, ou retardar a sua reprodução. Os agentes quimioterapêuticos incluem aqueles que são conhecidos dos especialistas, nomeadamente, entre outros: 5-fluorouracil (5-FU), azatioprina, ciclofosfamida, antimetabolitos (tais como Fludarabine), antineoplásticos (tais como Etoposide, Doxorubicin, metotrexato, e Vincristine), carboplatina, cisplatina e os taxanos, tais como taxol e taxotere. Tais agentes podem ser co-administrados a um sujeito com as variantes divulgadas da molécula de PA. Em alternativa ou adicionalmente, os agentes quimioterapêuticos podem ser

administrados antes de e/ou após a administração a um sujeito das variantes divulgadas da molécula de PA. Num exemplo, os agentes quimioterapêuticos são co-administrados com terapia hormonal e de radiações, em conjunto com as variantes divulgadas da molécula de PA, para tratamento de um carcinoma localizado da próstata.

Substituição conservadora: substituições de um ou mais aminoácidos (por exemplo, resíduos de 2, 5 ou 10) por resíduos de aminoácidos dotados de propriedade bioquímicas similares. Habitualmente, as substituições conservadoras têm um impacto reduzido ou nulo na actividade de um polipéptido resultante. A título de exemplo, idealmente, um péptido de PA modificado incluindo uma ou mais substituições conservadoras retém a actividade da proaerolisina. É possível produzir um polipéptido para conter uma ou mais substituições conservadoras por manipulação da sequência de nucleótidos que codifica esse polipéptido usando, por exemplo, procedimentos normais como mutagénese direccionada para o local ou PCR.

Variantes substitutivas são aquelas em que pelo menos um resíduo na sequência de aminoácidos foi removido sendo introduzido no seu lugar um resíduo diferente. Exemplos de aminoácidos que podem ser substituídos por um aminoácido original numa proteína e que são consideradas substituições conservadoras incluem: Ser por Ala; Lys por Arg; Gin ou His por Asn; Glu por Asp; Ser por Cys; Asn por Gin; Asp por Glu; Pro por Gly; Asn ou Gin por His; Leu ou Val por Ile; Ile ou Val por Leu; Arg ou Gin por Lys; Leu ou Ile por Met; Met, Leu ou Tyr por Phe; Thr por Ser; Ser por Thr; Tyr por Trp; Trp ou Phe por Tyr; e Ile ou Leu por Val.

Substituições permissivas são substituições de aminoácidos não conservadoras, mas também alteram significativamente a actividade da proaerolisina. Um exemplo é a substituição de Cys por Ala na posição 300 da SEQ N° ID: 2 ou 4.

É possível encontrar mais informações sobre substituições conservadoras em, entre outros, Ben-Bassat et al., (*J. Bacteriol.* 169:751-7, 1987), O'Regan et al. (*Gene* 77:237-51, 1989), Sahin-Toth et al. (*Protein Sci.* 3:240-7, 1994), Hochuli et al. (*Bio/Technology* 6:1321-5, 1988), WO 00/67796 (Curd et al.) e em manuais correntes de genética e biologia molecular.

Num exemplo, tais variantes podem ser facilmente seleccionadas para testes adicionais efectuando um ensaio (como os descritos nos Exemplos 2-5) para determinar se a variante retém a actividade da variante de PA.

Contém: termo que significa "incluindo." Por exemplo, "compreendendo A ou B" significa incluindo A ou B, ou tanto A como B, salvo indicação clara em contrário.

Deleção: remoção de uma sequência de um ácido nucleico, por exemplo DNA, ficando as regiões de ambos os lados ligadas em conjunto.

DNA: Ácido Desoxiribonucleico. O DNA é um polímero de cadeia longa que contém o material genético da maior parte dos organismos vivos (alguns vírus possuem genes que contêm ácido ribonucleico (RNA). As unidades repetitivas nos polímeros de DNA são quatro nucleótidos diferentes, cada um dos quais contém uma das quatro bases, adenina, guanina, citosina e timina ligada a um açúcar desoxirribose ao qual está ligado um grupo fosfato. Tripletos de nucleótidos, denominados codões, nas moléculas de DNA caracterizam um dado aminoácido num polipéptido. O termo codão é também usado para as sequências correspondentes (e complementares) de três nucleótidos no mRNA nos quais a sequência de DNA é transcrita

Reforçar: melhorar a qualidade, a quantidade ou a resistência de algo. Numa configuração, uma terapia reforça a capacidade de um sujeito para reduzir tumores, tais como o carcinoma da próstata, no sujeito se este for mais eficaz no combate aos tumores. Noutra configuração, uma terapia reforça

a capacidade de um agente para reduzir tumores, tais como o carcinoma da próstata, num sujeito se o agente for mais eficaz na redução de tumores. Tais reforços podem ser medidos usando os métodos divulgados no presente documento, por exemplo calculando a redução do volume do tumor (ver Exemplo 5).

Deleção funcional: mutação, deleção parcial ou completa, inserção, ou outra variação provocada a uma sequência genética que torna essa fracção da sequência genética não funcional.

Por exemplo, a deleção funcional de um domínio de ligação da PA provoca a diminuição da capacidade de PA para se ligar à, e concentrar-se na, membrana celular. A deleção funcional pode ser revertida inserindo um outro domínio de ligação funcional na proaerolisina, tal como um domínio de ligação específico da próstata, por exemplo um péptido LHRH.

Exemplos de métodos que podem ser usados para a deleção funcional de um domínio de ligação da proaerolisina, incluem, entre outros: deleção dos aminoácidos 1-83 da SEQ N° ID: 2 ou fragmentos da mesma, tais como dos aminoácidos 45-66 da SEQ N° ID: 2, ou inserção de uma ou mais das seguintes mutações numa variante da sequência de proaerolisina W45A, I47E, M57A, Y61 A, K66Q (os números de aminoácidos referem-se à SEQ N° ID: 2) (ver, por exemplo, Mackenzie *et al. J. Biol. Chem.* 274: 22604-22609, 1999).

Num outro exemplo, a deleção funcional de um local de clivagem original de furina PA resulta numa diminuição da capacidade da PA ser clivada e activada pela furina, quando comparada com uma molécula de PA de tipo selvagem.

Imobilizado: ligado a uma superfície, como uma superfície sólida. Uma superfície sólida pode ser polimérica, como polistireno ou polipropileno. Numa configuração, a superfície sólida tem a forma de uma conta. Numa outra configuração, a superfície inclui uma toxina de PA modificada, e em alguns

exemplos inclui ainda um ou mais elementos de ligação específicos da próstata, tais como péptido LHRH, anticorpo PSMA, e anticorpo de cadeia singular PSMA. Numa perspectiva ideal, a toxina de PA modificada é libertada da conta assim que esta atinge a célula prostática alvo. Métodos para imobilizar péptidos numa superfície sólida podem ser obtidos em WO 94/29436, e na Patente EUA N°. 5.858.358.

Exemplos de como as moléculas podem estar ligadas à conta incluem, entre outros: toxina de PA-local de clivagem de PSA-conta-elemento de ligação da próstata; ou elemento de ligação da próstata-conta-local da PSA-toxina da PA-local de clivagem da PSA-inibidor.

Isolado: Um componente biológico "isolado" (tal como uma molécula de ácido nucleico ou uma proteína) foi substancialmente separado ou purificado de outros componentes biológicos na célula do organismo no qual o componente ocorre naturalmente (ou seja, outro DNA e RNA cromossómico e extra cromossómico). Os ácidos nucleicos e as proteínas que foram objecto do "isolamento" incluem ácidos nucleicos e proteínas purificados por métodos de purificação normais. O termo engloba igualmente ácidos nucleicos e proteínas preparados por expressão recombinante numa célula hospedeira bem como ácidos nucleicos e proteínas sintetizados quimicamente.

Uma célula isolada é uma célula que foi substancialmente separada ou purificada de outros componentes biológicos do organismo no qual a célula ocorre naturalmente.

Malignas: células que possuem as propriedades de anaplasia, invasão e metástase.

Mamíferos: este termo inclui mamíferos humanos e não humanos. De igual modo, o termo "sujeito" inclui sujeitos humanos e animais. Exemplos de mamíferos incluem, entre outros: humanos, porcos, vacas, cabras, gatos, cães, coelhos e ratos.

Neoplasma: crescimento anormal de células.

Célula normal: célula não tumoral, não maligna, não infectada.

Oligonucleótido: sequência linear de polinucleótidos cujo comprimento pode chegar a cerca de 200 bases de nucleótidos, por exemplo um polinucleótido (tal como DNA ou RNA) cujo comprimento pode atingir pelo menos 6 nucleótidos, e chegando, por exemplo, a 15, 50, 100 ou 200 nucleótidos.

Operacionalmente ligada: uma primeira sequência de ácidos nucleicos está operacionalmente ligada a uma segunda sequência de ácidos nucleicos quando a primeira sequência de ácidos nucleicos se encontra numa relação funcional com a segunda sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, um promotor está operacionalmente ligado a uma sequência codificante se o promotor afectar a transcrição ou expressão da sequência codificante. De uma forma geral, as sequências de DNA operacionalmente ligada são contíguas e, se necessário para ligar as duas regiões codificantes da proteína, no mesmo quadro de leitura.

ORF ("open reading frame" ou quadro de leitura aberto): série de tripletos de nucleótidos (codões) que codificam aminoácidos sem qualquer codão de terminação. Estas sequências podem habitualmente traduzir-se para um péptido.

Polinucleótido: sequência linear de ácidos nucleicos de qualquer comprimento. Deste modo, um polinucleótido inclui moléculas com pelo menos 15, 50, 100, 200, 400, 500, 1000, 1100, ou 1200 (oligonucleótidos) e também nucleótidos tão compridos como cDNA longo ou cromossoma.

Proaerolisina: protoxina inactiva da aerolisina. O cDNA e a proteína de uma proaerolisina original ou de tipo selvagem são apresentados nas SEQ N° ID: 1 e 2, respectivamente.

Num exemplo, uma variante ou molécula modificada de proaerolisina inclui um local de clivagem de protease específico da próstata tal como um local de clivagem específico da PSA, que permite a activação da variante de PA na presença de uma protease específica da próstata tal como PSA, PMSA, ou HK2 (ver, por exemplo, FIGS. 5C-I). Num exemplo, um local de clivagem de protease específica da próstata é inserido no local de clivagem de furina da PA, de tal modo que a PA é activada na presença de uma protease específica da próstata, mas não da furina (ver, por exemplo, FIGS. 5D-I). Em alternativa, o local de clivagem da furina pode ser funcionalmente suprimido recorrendo à mutagénese de seis sequências de aminoácidos, e inserção de uma sequência de clivagem de protease específica da próstata (ver, por exemplo, FIG. 5C). Num outro exemplo, uma variante de molécula de PA inclui ainda deleção ou substituição de um ou mais, por exemplo pelo menos dois, aminoácidos de PA originais. Ainda num outro exemplo, uma variante da molécula de PA inclui também uma outra molécula (tal como um anticorpo ou um péptido) ligada ou acrescentada à (ou dentro da) variante da molécula de PA. Num outro exemplo, uma variante da molécula de PA inclui um domínio de ligação específico do tecido prostático.

Num outro exemplo, uma variante da molécula de PA inclui também um domínio de ligação funcionalmente suprimido (sobre aminoácidos 1-83 da SEQ N° ID: 2). As deleções funcionais podem fazer-se usando um qualquer método conhecido dos especialistas, tais como deleções, inserções, mutações, ou substituições. Entre os vários exemplos contam-se deleção de todo o domínio de ligação (ou porções do mesmo, (ver, por exemplo, FIGS. 5G-I), ou introdução de mutações pontuais (tais como as descritas acima (ver, por exemplo, FIGS. 5D-F), de que resulta um domínio de ligação com decréscimo de funções. Por exemplo, uma molécula de PA que tenha um domínio de ligação funcionalmente suprimido (e nenhuma sequência de ligação que o

substitua), terá uma menor capacidade de se acumular na membrana de uma célula, e por conseguinte de lisar células a uma velocidade inferior à de uma sequência de PA de tipo selvagem (ver, por exemplo, FIG. 5D). Igualmente divulgadas são variantes da molécula de PA nas quais o domínio de ligação original sofreu uma deleção funcional e foi substituído por um domínio de ligação específico de tecido prostático como se descreve abaixo (ver, por exemplo, FIGS. 5E-I).

Num outro exemplo, uma variante ou modificação da molécula de PA inclui um local de clivagem de furina, e um domínio de ligação funcionalmente suprimido que é substituído por um domínio de ligação específico do tecido prostático (ver, por exemplo FIGS. 5J-M). Tais variantes de moléculas de PA são direccionadas para células prostáticas através do domínio de ligação específico do tecido prostático, e activadas na presença da furina.

Exemplos específicos não exclusivos de variantes de proteínas de PSA são apresentados nas SEQ N° ID: 4, 7, 10, 13, 24, e 25.

A actividade da PA modificada é a actividade de um agente na qual a lise das células é afectada. As células incluem, entre outras, células secretoras de protease específica da próstata, tais como células secretoras de PSA, tais como células prostáticas cancerígenas, tais como células prostáticas cancerígenas de proliferação lenta. Os agentes incluem, entre outros, proteínas de PA modificadas, ácidos nucleicos, agentes de ligação específicos, incluindo variações, mutações, polimorfismos, fusões, e fragmentos das mesmas, divulgados no presente documento. Num exemplo, refere-se que a actividade da PA modificada é reforçada quando proteínas ou ácidos nucleicos de PA modificada, em contacto com uma célula secretora de PSA (tal como célula prostática cancerígena), promovem a lise e morte da célula, por exemplo de pelo menos 10%, ou por exemplo de pelo menos 25%, 50%, 100%, 200% ou mesmo 500%, quando em comparação com a lise de uma célula não produtora de PSA.

Noutros exemplos, refere-se que a actividade da PA modificada é reforçada quando proteínas e ácidos nucleicos de PA modificada, em contacto com um tumor, diminuem o volume das células do tumor, tal como um tumor prostático, por exemplo de pelo menos 10%, ou por exemplo de pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, ou mesmo 100% (completado com a eliminação do tumor).

Ensaio que podem ser usados para definir se um agente possui actividade de PA modificada são descritos no documento, por exemplo nos Exemplos 2-5 e 9. A título de exemplo, é possível avaliar a capacidade de um péptido de PA modificado para a lise específica de células produtoras de PSA (Exemplos 2 e 5), para ser estável no plasma humano (Exemplo 3), para ser um substrato eficiente para a actividade enzimática da PSA (Exemplo 9). A actividade de proteínas funcionais pode ser detectada pela lise preferencial de células produtoras de PSA versus células não produtoras de PSA, decréscimo do volume do tumor prostático, menor toxicidade em comparação com PA de tipo selvagem, e maior estabilidade no sangue em comparação com PA de tipo selvagem.

É possível recorrer a ensaios similares para determinar se qualquer agente de PA modificado divulgado no presente pode diminuir o volume de tumores (como um tumor prostático) e especificamente lisar células produtoras de PSA. Por exemplo, é expectável que os péptidos de PA modificada apresentados nas SEQ N° ID: 4, 24, e 25, reduzam o volume do tumor prostático. Qualquer um destes ensaios pode ser modificado usando uma expressão *in vivo* de um gene de PA modificada, e variações, fusões e fragmentos do mesmo, em vez da administração de proteínas modificadas

Promotor: conjunto de sequências de controlo de ácidos nucleicos que dirigem a transcrição de um ácido nucleico. Um promotor inclui sequências de ácidos nucleicos necessárias e próximas do sítio de início da transcrição, tal como no caso

de um promotor do tipo polimerase II, um elemento TATA. Um promotor inclui também opcionalmente um elemento distal estimulador ou repressor que se podem localizar a uma distância de vários milhares de pares de bases do local de início da transcrição.

Promotor específico da próstata: promotor responsável pela testosterona e outros androgénios, que pode, pois, promover a expressão genética nas células prostáticas. Entre os exemplos contam-se, nomeadamente, o promotor da probasina; o promotor do antigénio específico da próstata (PSA); o promotor do antigénio específico da membrana da próstata (PSMA); e o promotor da calicreína glandular humana 2 (HK2).

Local de clivagem de protease específica da próstata: sequência de aminoácidos que é reconhecida e específica e eficientemente hidrolisada (clivada) por uma protease específica da próstata. Os exemplos incluem, entre outros, um local de clivagem específico de PSA, um local de clivagem específico do PSMA e um local de clivagem específico da HK2.

Um local de clivagem específico de PSA é uma sequência de aminoácidos que é reconhecida e específica e eficientemente hidrolisada (clivada) pelo antigénio específico da próstata (PSA). Tal sequência de péptidos pode ser introduzida noutras moléculas, tais como PA, para produzir pró-fármacos que são activados por PSA. Mediante activação da PA modificada por PSA, a PA é activada e pode exercer a sua citotoxicidade. Exemplos de locais de clivagem específicos de PSA, incluem, entre outros, os apresentados nas SEQ N° ID: 5, 8, 11, e 14-21, os divulgados nas Patentes EUA N°. 5.866.679 para DeFeo-Jones *et al.*, 5.948.750 de Garsky *et al.*, 5.998.362 de Feng *et al.*, 6.265.540 de Isaacs *et al.*, 6.368.598 de D'Amico *et al.*, e 6.391.305 de Feng *et al.* J&A

É possível encontrar exemplos específicos de locais de clivagem específicos de PSMA em WO/0243773 de Isaacs e

Denmeade (aqui incorporados a título de referência). Exemplos específicos de locais de clivagem específicos de HK2 são divulgados em WO/0109165 de Denmeade *et al.*

Domínio de ligação específico do tecido prostático: uma molécula, tal como um ligando de péptido, uma toxina ou um anticorpo, que apresenta uma maior especificidade para células prostáticas do que para outros tipos de células. Num exemplo, um domínio de ligação específico do tecido prostático possui um mais baixo KD em tecido ou células da próstata do que noutros tipos de células, (ou seja, liga-se selectivamente a tecidos prostáticos quando em comparação com outros tecidos normais do sujeito), por exemplo um KD 10 vezes mais baixo, ou por exemplo um KD pelo menos 20, 50, 75, 100 ou mesmo 200 vezes mais baixo. Tais sequências podem ser usadas para direccionar um agente, como uma variante da molécula de PA, para a próstata. Os exemplos incluem, entre outros: anticorpos que reconhecem proteínas que são relativamente específicas da próstata tais como PSA, PSMA, hK2, prostasina, e hepsina; ligandos que possuem receptores selectivos da próstata tais como hormonas libertadoras da hormona luteinizante (LHRH), de origem natural e sintética; e endotelina (que se liga ao receptor de endotelina correlacionado).

Purificado: o termo "purificado" não requer uma pureza absoluta; é, isso sim, um conceito relativo. Assim, a título de exemplo, uma proteína ou uma preparação de ácido nucleico substancialmente purificadas (tais como as toxinas de PA modificada divulgadas no presente) são aquelas em que a proteína ou o ácido nucleico em causa apresentam maior pureza do que a proteína no seu ambiente natural no interior de uma célula ou de uma câmara de reacção de produção (conforme o caso). Por exemplo, uma preparação de uma proteína de PA modificada é purificada se a proteína representar pelo menos 50%, ou por exemplo pelo menos 70%, do conteúdo de proteína total da preparação. Os métodos para a purificação de

proteínas e ácidos nucleicos são bem conhecidos na especialidade. Exemplos de métodos que se podem usar para purificar uma proteína, tal como uma PA modificada, incluem, entre outros, os métodos divulgados em Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Cap. 17).

Recombinante: um ácido nucleico recombinante é aquele que possui uma sequência que não ocorre naturalmente ou uma sequência resultante da combinação artificial de dois segmentos de sequência normalmente separados. Esta combinação artificial é muitas vezes obtida por síntese química ou, mais habitualmente, pela manipulação artificial de segmentos isolados de ácidos nucleicos, por exemplo, técnicas de engenharia genética. Uma proteína recombinante é aquela que resulta de expressar um ácido nucleico recombinante que codifica a proteína.

Amostra: amostras biológicas que contêm DNA, cDNA, RNA, ou proteína genómica obtidas das células de um sujeito, tais como as que se encontram em sangue periférico, urina, saliva, sêmen, biópsia de tecidos, espécimes cirúrgicos, aspirados de agulhas finas, amostras de amniocentese e material de autópsia. Num exemplo, uma amostra inclui células cancerígenas prostáticas obtidas de um sujeito.

Identidade/similaridade de sequências: a identidade/similaridade entre duas ou mais sequências de ácidos nucleicos, ou duas ou mais sequências de aminoácidos, exprime-se em termos da identidade ou similaridade entre as sequências. A identidade de sequências pode ser medida em termos de identidade percentual; quanto mais elevada a percentagem, mais idênticas são as sequências. A similaridade de sequências pode ser medida em termos de similaridade percentual (que leva em conta substituições conservadoras de aminoácidos); quanto mais elevada a percentagem, mais similares são as sequências.

Os métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na especialidade. Vários programas e algoritmos de alinhamento encontram-se descritos em: Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpetera/./vwc. *Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang et al. *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992; e Pearson et al., *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990, apresentam análises detalhadas de métodos de alinhamento de sequências e cálculos de homologia.

A NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990) pode ser obtida a partir de diversas fontes, incluindo o National Center for Biological Information (NCBI, National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894) e na Internet, para utilização em associação com os programas de análise de sequências blastp, blastn, blastx, tblastn e tblastx. É possível obter informações adicionais no sítio web do NCBI.

Para comparação de sequências de aminoácidos com mais de 30 aminoácidos, utiliza-se a função de sequências Blast 2 usando o conjunto da matriz predefinida BLOSUM62 para parâmetros predefinidos, (custo da existência do espaçamento de 11, e um custo de espaçamento por resíduo de 1). Ao alinhar péptidos curtos (com menos de 30 aminoácidos), o alinhamento deve ser feito usando a função de sequências Blast 2, usando o conjunto da matriz PAM30 para parâmetros predefinidos (espaçamento aberto 9, penalização de extensão do espaçamento de 1). As proteínas com similaridade ainda maior para a sequência de referência apresentam identidades percentuais crescentes quando avaliadas por este método, tais como pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou mesmo 99% de identidade de sequência. Quando se compara menos do que toda a sequência

para efeitos de identidade da sequência, os homólogos possuem habitualmente pelo menos 75% de identidade de sequência em curtas janelas de 10-20 aminoácidos, e podem apresentar identidades de sequência de pelo menos 85%, 90%, 95% ou 98% dependendo da sua identidade para a sequência de referência. Os métodos para determinar a identidade de sequências em janelas tão curtas estão descritos no sítio web do NCBI.

Os homólogos de proteínas são tipicamente caracterizados por possuírem pelo menos 70%, ou pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou até mesmo 98% de identidade de sequência, contada em todo o comprimento do alinhamento com a sequência de aminoácidos usando a NCBI Basic Blast 2.0, blastp espaçado com bases de dados como a base de dados nr ou swissprot. As pesquisas feitas com o programa blastn são filtradas com DUST (Hancock and Armstrong, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:67-70). Outros programas recorrem ao SEG.

Um especialista verificará que estes intervalos de identidade de sequências são apresentados unicamente a título orientativo; é possível que se possam obter homólogos altamente significativos fora dos intervalos apresentados. Apresentadas aqui são os homólogos de péptidos descritos acima, bem como moléculas de ácidos nucleicos que codificam tais homólogos.

As sequências de ácidos nucleicos que não apresentam um elevado grau de identidade podem não obstante codificar sequências de aminoácidos idênticas ou similares (conservadas), devido à degeneração do código genético. Podem fazer-se alterações numa sequência de ácidos nucleicos usando esta degeneração para produzir múltiplas moléculas de ácidos nucleicos que codificam substancialmente a mesma proteína. Tais péptidos homólogos podem, por exemplo, possuir pelo menos 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, ou 99% de identidade de sequência determinada por este método. Quando se compara menos do que toda a sequência para efeitos de identidade de sequência, os

homólogos podem, por exemplo, possuir pelo menos 75%, 85% 90%, 95%, 98% ou 99% de identidade de sequência em curtas janelas de 10-20 aminoácidos. Os métodos para determinar a identidade de sequências em janelas tão curtas podem ser obtidos no sítio web do NCBI. Um especialista verificará que estes intervalos de identidade de sequências são apresentados unicamente a título orientativo; é possível que se possam obter homólogos significativos ou outras variantes fora dos intervalos apresentados.

Sujeito: organismos vertebrados multicelulares vivos, uma categoria que inclui sujeitos tanto humanos como animais, que requerem um aumento no efeito biológico pretendido. Os exemplos incluem, entre outros: humanos, macacos, cães, gatos, ratos, coelhos, gatos, cavalos, porcos e vacas.

Quantidade com eficácia terapêutica: uma quantidade suficiente para obter um efeito biológico desejado, por exemplo uma quantidade que é eficaz para diminuir o tamanho (ou seja, o volume), os efeitos secundários e/ou as metástases do cancro da próstata. Num exemplo, é uma quantidade suficiente para diminuir os sintomas ou efeitos de um carcinoma da próstata, como o tamanho do tumor. Em exemplos específicos, é uma quantidade eficaz para diminuir o tamanho de um tumor da próstata e/ou metástases da próstata em pelo menos 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mesmo 100% (eliminação completa do tumor).

Em exemplos específicos, é uma quantidade de uma molécula de PA modificada eficaz para diminuir um tumor da próstata e/ou uma quantidade de células prostáticas cancerígenas lisadas por uma PA modificada, como num sujeito a quem é administrada, por exemplo um sujeito com um ou mais carcinomas da próstata. Noutros exemplos, é uma quantidade de uma molécula de PA modificada e/ou uma quantidade de células prostáticas cancerígenas lisadas por tal molécula de PA modificada, eficaz para diminuir as metástases de um carcinoma da próstata.

Numa configuração, a quantidade com eficácia terapêutica inclui também uma quantidade de PA modificada e/ou uma quantidade de células prostáticas cancerígenas lisadas por uma PA modificada suficiente para obter um efeito desejado num sujeito em tratamento. Por exemplo, esta pode ser uma quantidade necessária para melhorar os sinais e/ou sintomas de uma doença como um cancro, por exemplo cancro da próstata.

Uma quantidade eficaz de PA modificada e/ou células prostáticas cancerígenas lisadas por tal molécula de PA modificada pode ser administrada numa dose única, ou em várias doses, por exemplo diariamente, no decurso de um tratamento. Todavia, a quantidade eficaz depende do sujeito em tratamento, da gravidade e do tipo da condição em tratamento, e do método de administração. Por exemplo, uma quantidade com eficácia terapêutica de PA modificada pode variar entre cerca de 1-10 mg por 70 kg de peso corporal, por exemplo cerca de 2,8 mg, em caso de administração iv e cerca de 10-100 mg por 70 kg de peso corporal, por exemplo cerca de 28 mg, em caso de administração intraprostática ou intratumoral. Adicionalmente, uma quantidade com eficácia terapêutica de células prostáticas cancerígenas lisadas por PA (variante ou de tipo selvagem) pode oscilar entre cerca 10^6 e 10^8 células.

Dose com eficácia terapêutica: num exemplo, uma dose de PA modificada suficiente para diminuir o volume das células de um tumor, como um carcinoma da próstata, num sujeito a quem é administrada, de que resulte a regressão da uma condição patológica, ou que seja capaz de aliviar os sinais ou sintomas causados pela condição. Num exemplo específico, trata-se de uma dose de PA modificada suficiente para diminuir as metástases de um cancro da próstata.

Ainda num outro exemplo, uma dose de lisado celular resultante do contacto de células com uma PA modificada suficiente para diminuir o volume das células de um tumor, como um carcinoma da próstata, num sujeito a quem é

administrado, de que resulte a regressão da uma condição patológica, ou que seja capaz de aliviar os sinais ou sintomas causados pela condição. Num exemplo específico, é uma dose de lisado celular resultante do contacto de células com uma PA modificada ou de tipo selvagem suficiente para diminuir as metástases de um cancro da próstata.

Tumor: neoplasma. Inclui tumores sólidos e hematológicos (ou líquidos).

Exemplos de tumores hematológicos incluem, entre outros: leucemias, incluindo leucemias agudas (tais como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielogénica aguda e mieloblástica, promielócito, mielomonocítico, monocítico e eritroleucemia), leucemias crónicas (tais como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielogénica crónica, e leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin (incluindo graus baixo, intermédio, e alto), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença das cadeias pesadas, síndrome mielodisplásico, linfoma de células do manto e mielodisplasia.

Exemplos de tumores sólidos, tais como sarcomas e carcinomas, incluem, entre outros: fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, osteossarcoma, e outros sarcomas, sarcoma sinovial, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma do cólon, cancro linfóide, cancro do pâncreas, cancro da mama, cancro do pulmão, cancro do ovário, cancro da próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma das glândulas sudoríparas, carcinoma das glândulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma das células renais, hepatoma, carcinoma das vias biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cancro cervical, tumor testicular, carcinoma da

bexiga, e tumores do SNC (tais como a glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma).

Transformada: uma célula transformada é uma célula na qual foi introduzida uma molécula de ácido nucleico por técnicas de biologia molecular. Tal como utilizado no presente documento, o termo transformação abrange todas as técnicas pelas quais uma molécula de um ácido nucleico pode ser introduzida em tal célula, incluindo transfecção com vectores virais, transformação com vectores plasmídicos, e introdução de DNA nu por electroporação, lipofecção, e técnica de aceleração de partículas.

Célula transgénica: células transformadas que contêm DNA estranho, não original.

Mamífero transgénico: mamíferos transformados que contêm DNA estranho, não original. Numa configuração, o DNA não original é uma PA modificada que inclui um local de clivagem de PSA, tal como o da SEQ N° ID: 3, ou uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma proteína apresentada nas SEQ N° ID: 24 ou 25.

Variantes ou fragmentos ou fusões de proteínas: a produção de proteína de PA modificada pode ser concretizada de várias formas (por exemplo, ver Exemplos 12 e 16). As sequências de DNA que codificam uma proteína da PA modificada ou proteína de fusão, ou um fragmento ou variante de uma proteína (por exemplo, um fragmento ou variante com 80%, 90% ou 95% de identidade de sequência para uma PA modificada) pode ser fabricada para permitir que a proteína seja expressa em células ou organismos eucarióticos, bactérias, insectos, e/ou plantas. Para obter expressão, a sequência de DNA pode ser alterada e operacionalmente ligada a outras sequências reguladoras. O produto final, que contém as sequências

reguladoras e a proteína PA modificada terapêutica, é citado como um vector. Este vector pode ser introduzido em células eucarióticas, bactérias, insectos e/ou plantas. Uma vez introduzida a célula, o vector possibilita que a proteína seja produzida.

Uma proteína de fusão que inclui uma PA modificada (ou variações, polimorfismos, mutações, ou fragmentos da mesma) ligada a outras sequências de aminoácidos que não inibem a actividade pretendida da proteína, a capacidade para a lise de células secretoras de PSA. Num exemplo, as outras sequências de aminoácidos não são mais do que resíduos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, ou 50 aminoácidos de comprimento.

Um especialista verificará que o DNA pode ser alterado de inúmeras formas sem afectar a actividade biológica da proteína codificada. Por exemplo, é possível usar PCR para produzir variações na sequência de DNA que codifica uma variante de toxina de PA. Tais variações podem ser optimizadas para preferência de codões numa célula hospedeira usada para exprimir a proteína, ou outras alterações de sequência que facilitam a expressão.

Vector: uma molécula de ácido nucleico tal como introduzida numa célula hospedeira, dando assim origem a uma célula hospedeira transformada. Um vector pode incluir sequências de ácidos nucleicos que lhe permitem replicar-se na célula hospedeira, como uma origem de replicação. Um vector pode também incluir um ou mais genes marcadores seleccionáveis e outros elementos genéticos conhecidos na especialidade.

É possível obter definições adicionais de termos habitualmente usados na genética molecular em Benjamin Lewin, *Genes* V publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and*

Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Variantes da molécula de proaerolisina

As toxinas bacterianas, como a aerolisina produzida pela *Aeromonas hydrophilia* e uma hemolisina produzida pela *Staph aureus*, são proteínas de folha beta que oligomerizam na membrana plasmática para produzir poros que conduzem a uma rápida morte celular citolítica (FIG. 1). A formação de poros rompe fisicamente a membrana das células, e provoca a morte das células em todas as fases do ciclo celular, incluindo células não proliferantes (ou seja, retidas em G0). Contudo, a aerolisina de tipo selvagem mata as células indiscriminadamente. O presente documento divulga uma forma de protoxina inactiva de aerolisina (uma variante de PA) que pode ser direccionada para, e activada por, proteínas específicas do cancro da próstata. Uma vantagem das variantes divulgadas da molécula de PA para o tratamento do cancro da próstata metastático e localizado é que combina uma terapia que não depende da proliferação com a administração de fármacos específicos da próstata, de que resultam efeitos secundários mínimos para os doentes. Um especialista compreenderá que outras protoxinas, tais como a toxina alfa *Clostridium septicum*, a toxina delta *Bacillus thuringiensis* e a perforina humana podem ser substituídas por proaerolisina.

O presente documento divulga variantes da molécula de PA, incluindo sequência de DNA e proteínas, que incluem uma sequência de clivagem de protease específica da próstata. Exemplos de sequências de clivagem de protease específica da próstata incluem, entre outras: sequências de clivagem de PSA, PSMA, e HK2. A sequência de clivagem de protease específica da próstata substitui funcionalmente o local de clivagem da furina original de PA (ver, por exemplo, FIGS. 5B-I). Desta substituição resulta uma variante de proaerolisina que apenas se torna citoliticamente activa na presença de proteases

activas enzimaticamente, tais como PSA, PSMA, ou hK2. PSA é uma serina protease com a capacidade de reconhecer e hidrolisar sequências específicas de péptidos. É segregada por células prostáticas normais e malignas numa forma enzimaticamente activa e fica desactivada depois de entrar na circulação. Uma vez que nem o sangue nem os tecidos normais para além da próstata contêm PSA enzimaticamente activo, a actividade proteolítica do PSA foi usada para activar protoxinas em locais de cancro da próstata. Pode ser usado qualquer local de clivagem de PSA, PSMA, ou hK2. Exemplos de locais de clivagem de PSA, incluem, entre outros, os apresentados nas SEQ N° ID: 5, 8, 11, e 14-21. Num exemplo específico, o local de clivagem de PSA inclui a SEQ N° ID: 5.

Em alguns exemplos, o local de clivagem da furina de PA (aminoácidos 427-432 da SEQ N° ID: 2) é suprimido e é inserido um local de clivagem de protease específico da próstata, tal como um local de clivagem de PSA (ver, por exemplo, FIG. 5B). Noutros exemplos, o local de clivagem da furina de PA sofre uma mutação e um local de clivagem de protease específico da próstata, tal como um local de clivagem de PSA, é introduzido no ou acrescentado ao terminal N- ou C- do local da furina (ver, por exemplo, FIG. 5C).

Igualmente divulgadas são variantes da molécula de PA nas quais o domínio de ligação da PA é funcionalmente suprimido (ver, por exemplo, FIGS. 5D-M). Tais variantes da molécula de PA podem conter um local de clivagem de furina original (ver, por exemplo, FIGS. 5J-M), no qual o direccionamento para células prostáticas é conseguido substituindo funcionalmente o domínio de ligação da PA por um domínio de ligação específico do tecido prostático. Em alternativa, as variantes da molécula de PA contêm um local de clivagem de protease específica da próstata (ver, por exemplo, FIGS. 5D-I), no qual a activação das protoxinas ocorre primordialmente em células que segregam uma protease específica da próstata. O domínio de ligação da

PA inclui os aminoácidos 1-83 da SEQ N° ID: 2. O domínio de ligação pode ser funcionalmente suprimido usando qualquer método conhecido na especialidade, por exemplo por deleção de todos ou de alguns dos aminoácidos do domínio de ligação, tal como deleção dos aminoácidos 1-83 da SEQ N° ID: 2 ou 4 (ver, por exemplo, FIG. 5G), ou a deleção de um ou mais aminoácidos apresentados como aminoácidos 45-66 da SEQ N° ID: 2 ou 4 (ver, por exemplo, FIG. 5D em que * representa uma ou mais deleções). Noutros exemplos, o domínio de ligação é funcionalmente suprimido por introdução de uma ou mais mutações específicas de sítio na variante da sequência de PA, tal como W45A, I47E, M57A.Y61 A, e K66Q da SEQ N° ID: 2 ou 4 (ver, por exemplo, FIG. 5D, em que * representa uma ou mais mutações).

São divulgadas variantes da molécula de PA que incluem um domínio de ligação específico do tecido prostático que substitui funcionalmente o domínio de ligação de PA original (ver, por exemplo FIGS. 5E, 5F, 5H e 5I-M). O uso de um ou mais domínios de ligação específicos do tecido prostático pode aumentar o direccionamento das variantes divulgadas da molécula de PA para as células prostáticas e respectivas metástases. São conhecidos vários domínios de ligação específicos de tecido prostático. Entre os exemplos inclui-se uma sequência da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH), como as que se apresentam nas SEQ N° ID: 22 e 23, e anticorpos que reconhecem PSA e/ou PSMA.

Um ou mais domínios de ligação específicos do tecido prostático podem estar ligados a um ou mais aminoácidos das variantes divulgadas da molécula de PA, mas idealmente não interferem significativamente com a capacidade da variante da PA ser activada por uma protease específica da próstata tal como PSA, e a capacidade de formar poros em membranas celulares. A título de exemplo, domínios de ligação específicos do tecido prostático podem ser ligados ou

inseridos num terminal N- e/ou C- de uma variante de PA (ver, por exemplo, FIGS. 5E e 5H). Em alguns exemplos, o domínio de ligação original de PA é suprimido (ou seja, os aminoácidos 1-83 da SEQ N° ID: 2 ou 4), de tal modo que a fixação ou ligação de um domínio de ligação específico do tecido prostático ao terminal N- resulta numa fixação ao aminoácido 84 da SEQ N° ID: 2 ou 4 (ver, por exemplo, FIGS. 5H e 5L). Noutros exemplos, são introduzidas pequenas deleções ou mutações pontuais no domínio de ligação original de PA, de tal modo que a fixação ou ligação de um domínio de ligação específico do tecido prostático ao terminal N- resulta numa fixação ao aminoácido 1 da SEQ N° ID: 2 ou 4 (ou qualquer outro aminoácido que seja N terminal na sequência da deleção funcional do domínio de ligação de PA original) (ver, por exemplo, FIGS. 5E e 5I). Em alguns exemplos, o aminoácido N-terminal de PA é alterado para um Cys ou outro aminoácido antes de se fixar ao domínio de ligação específico do tecido prostático, para apoiar a ligação do domínio de ligação específico do tecido prostático à variante da proteína de PA.

Em alternativa ou adicionalmente, um ou mais domínios de ligação específicos do tecido prostático podem fixar-se ou ligar-se a outros aminoácido de uma variante da molécula de PA, tal como os aminoácidos 215 ou 300 da SEQ N° ID: 2 ou 4 (ver, por exemplo, FIGS. 5F, 5I, 5K e 5M); Em alguns exemplos, um aminoácido Cys substitui o aminoácido original nessa posição. A título de exemplo, podem ser feitas as seguintes alterações às SEQ N° ID: 2 ou 4: Tyr215Cys ou A1a300Cys. Num exemplo, em que o domínio de ligação específico do tecido prostático é um anticorpo, a reticulação pode ser usada para fixar anticorpos a uma variante de PA, por exemplo fazendo reagir grupos amino no anticorpo com cisteína localizada na variante de PA (tal como aminoácidos Cys19, Cys75, Cys159, e/ou Cys164 da SEQ N° ID: 2).

Igualmente divulgadas são variantes específicas da molécula de PA, tais como as que se apresentam nas SEQ N° ID: 3, 4, 6, 7, 9, 10,12, 13, 24 e 25.

Em alguns exemplos, as variantes divulgadas da molécula de PA estão ligadas a ou imobilizadas numa superfície do género de uma gota. A gota pode também incluir um ligando específico da próstata para reforçar o direccionamento para uma célula prostática, tal como uma célula prostática cancerígena localizada ou metastizada.

Tratamento do cancro da próstata com proaerolisina modificada

As variantes da molécula de PA divulgadas e analisadas acima são especificamente activadas para potentes citotoxinas no interior de sítios prostáticos cancerígenos por via da actividade proteolítica de proteases específicas da próstata como PSA, PSMA, e hK2. O direccionamento em alguns exemplos é conseguido pela inclusão de um ou mais domínios de ligação específicos do tecido prostático, tais como péptido de LHRH que se pode ligar ao seu receptor de LHRH correlacionado expresso por células prostáticas cancerígenas, ou anticorpos PSMA ou LHRH, os quais se podem ligar a PSMA ou LHRH expresso na superfície das células prostáticas cancerígenas. Um especialista reconhecerá que o uso de uma variante da molécula de PA, que inclui um local de clivagem e um péptido de LHRH ou anticorpo, pode ser usado para tratar outros cancros que exprimem receptores LHRH, tais como melanomas e cancros da mama, do ovário e dos pulmões, usando as variantes da molécula de PA e os métodos divulgados no presente documento. Adicionalmente, um especialista reconhecerá que o uso de uma variante da molécula de PA que inclui um local de clivagem de furina ou PSMA, e/ou um anticorpo de PSMA, pode ser usada para tratar outros cancros nos quais o PSMA está expresso (por exemplo, na vasculatura do tumor), tais como cancros da mama, do cólon, dos rins, da bexiga e do cérebro, usando as

variantes da molécula de PA e os métodos divulgados no presente.

As variantes divulgadas da molécula de PA, tais como ácidos nucleicos e/ou proteínas, podem ser administradas local ou sistemicamente usando qualquer método conhecido na especialidade, a sujeitos com cancro da próstata localizado e metastático. Adicionalmente, as variantes divulgadas da molécula de PA podem ser administradas a um sujeito para terapia imunoestimulante. Devido à especificidade da ligação e da activação das variantes divulgadas da molécula de PA, a administração local e sistémica deve ter efeitos mínimos sobre os tecidos normais de um doente e, idealmente, produzir efeitos secundários reduzidos ou nulos.

Num exemplo, as variantes divulgadas da molécula de PA são injectadas na glândula prostática (intraprostaticamente) e/ou no tumor prostático (intratumoralmente) num sujeito com cancro da próstata, tal como um tumor localizado. Tal injeção localizada e subsequente lise das células prostáticas cancerígenas no interior da glândula prostática pode produzir um efeito imunoestimulante conducente a uma diminuição ou eliminação da doença micrometastática nos sujeitos tratados. Deste modo, a doença sistémica é tratada ou reduzida através de uma terapia minimamente tóxica, de aplicação local.

Adicionalmente, ou em alternativa, as variantes divulgadas da molécula de PA podem ser administradas sistemicamente, por exemplo por via intravenosa, intramuscular, subcutânea, ou oral, a um sujeito com cancro da próstata, como um tumor prostático metastático. A terapia sistémica pode também ter um efeito imunoestimulante anti-tumoral. As variantes divulgadas da molécula de PA que incluem um local de clivagem de PSA não são hidrolisadas por serina proteases ou PSA enzimaticamente inactivo no sangue. Em vez disso, as variantes não hidrolisadas divulgadas da molécula de PA são administradas por via do sangue ao fluido extracelular no interior de

depósitos cancerígenos metastáticos onde podem ser hidrolisadas para a toxina terapêutica activa pela PSA enzimaticamente activa segregada por estas células prostáticas cancerígenas. Uma vez hidrolisada, a toxina libertada entra nas células próximas produtoras e não produtoras de PSA na vizinhança imediata devido à sua elevada capacidade de penetrar na membrana e induz a morte citolítica destas células.

É igualmente divulgado um método adicional para o tratamento sistémico do cancro da próstata num sujeito. Neste método, as células prostáticas cancerígenas são retiradas do sujeito com cancro da próstata, tal como um tumor prostático metastático. Em alternativa, ou adicionalmente, podem ser usadas linhagens de células prostáticas cancerígenas. Exemplos de linhagens de células prostáticas cancerígenas que se podem usar incluem, entre outras: células produtoras de PSA como LNCaP (tais como ATTC N°. CRL-1740 e CRL-10995) e CWR22R (ATCC N°. CRL-2505 e Nagabhushan *et al*, *Cancer Res.* 56(13):3042-6, 1996), ou células não produtoras de PSA tais como PC-3 (ATCC N°. CRL-1435) e DU 145 (ATCC N°. HTB-81). As células ou linhagens celulares removidas são incubadas ou contactadas pelas variantes divulgadas da molécula de PA. Esta incubação resulta na lise das células pela variante da molécula de PA, e a produção de um lisado celular que é administrado ao sujeito. Num exemplo, o método inclui ainda a administração de factores imunoestimulantes, lisados de células prostáticas cancerígenas fabricados para produzirem factores imunoestimulantes, e/ou células prostáticas cancerígenas irradiadas (incluindo células prostáticas cancerígenas fabricadas para produzirem factores imunoestimulantes). Exemplos de factores imunoestimulantes incluem, entre outros: factor estimulante do crescimento de granulócitos-macrófagos (GM-CSF); membros da família de proteínas das interleucinas tais como, entre outras, interleucina-2 e interleucina-6, factor estimulante da colonização de granulócitos (G-CSF); e membros da família dos

interferções, como o interferão alfa, beta ou gama. A administração de tais substâncias a um sujeito pode fazer-se em simultâneo com o lisado celular (co-administração), antes da administração do lisado celular, e/ou subsequente à administração do lisado celular.

Num exemplo, tal administração reforça a capacidade de um sujeito para reduzir o volume de um tumor prostático e/ou tumor metastático. A título de exemplo, os métodos divulgados podem reduzir o volume das células do tumor prostático e/ou o volume das células do tumor metastático, de pelo menos 10%, ou de pelo menos 20% ou mais. Adicionalmente, os métodos divulgados podem resultar numa redução dos sintomas associados a um tumor prostático e/ou a um tumor prostático metastático.

As variantes divulgadas da molécula de PA podem ser administradas como uma terapia de modalidade única ou em combinação com outras terapias, tais como terapia de radiação e/ou terapias ablativas de androgénio (tais como agonistas/antagonistas de receptor LHRH, antiandrogénios, estrogénios, inibidores da síntese de esteróides adrenais cetoconazol e aminoglutetimida). Adicionalmente, a administração das variantes divulgadas da molécula de PA pode fazer-se isoladamente ou em combinação com um portador aceitável do ponto de vista farmacêutico, e/ou em combinação com outros compostos terapêuticos, como aqueles que reduzem a produção de anticorpos às variantes administradas de proteínas de PA (por exemplo Rituximab e esteróides) e outros agentes anti-tumorais.

A divulgação de certos exemplos específicos não pretende excluir outras configurações. Adicionalmente, quaisquer tratamentos descritos no presente documento não excluem necessariamente outros tratamentos, mas podem ser combinados com outros agentes bioactivos ou modalidades de tratamento.

EXEMPLO 1

Produção de toxinas de proaerolisina activadas por PSA

Este exemplo descreve métodos usados para produzir as variantes de toxinas de proaerolisina apresentadas na Tabela 1, as quais são activadas por PSA. Um especialista compreenderá que se podem usar métodos similares para produzir outras variantes de proteínas da proaerolisina, as quais são activadas por PSA ou qualquer outra protease específica da próstata. Tais proteínas podem ser produzidas substituindo a sequência da furina de proaerolisina por um local de clivagem de protease específica da próstata, como uma sequência de clivagem específica da PSA (ver Exemplo 9).

Tabela 1: Variantes da proaerolisina específicas de PSA

Mutante (SEQ N° ID)	Mudança(s) efectuada(s) (SEQ N° ID)	Comparação para Proaerolisina de tipo selvagem ADSKVRRARSVDGAGQGLRLEIPLD (aa 424-448 da SEQ N° ID: 2)
PSA-PA 1 (3 e 4)	KVRRAR (aa 427-432 da SEQ N° ID: 2) alterada para HSSKLQ (5)	ADSHSSKLQSDGAGQGLRLEIPLD (aa 424-448 da SEQ N° ID: 4)
PSA-1K (6 e 7)	KVRRARSV (aa 427-434 da SEQ N° ID: 2) alterada para HSSKLQSA (8)	ADSHSSKLQSADGAGQGRLEIPLD (aa 424-448 da SEQ N° ID: 7)
PSA-PA2 (9 e 10)	KVRRAR (aa 427-432 da SEQ N° ID: 2) alterada para QFYSSN (11)	ADSQF YSSNS VDG A GQGLRLEIPLD (aa 424-448 da SEQ N° ID: 10)
PSA-PA3 (12 e	KVRRAR (aa 427-432 da SEQ N° ID: 2) alterada	ADSGISSFQSSVDGAGQGLRLEIPLD (aa 424-448 da SEQ N° ID:

13)	para GISSFQS (14)	13)
-----	-------------------	-----

As variantes ou modificações de proaerolisina (PA) apresentadas na Tabela 1 incluem uma sequência de proaerolisina (PA de tipo selvagem apresentada nas SEQ N° ID: 1 e 2) nas quais o local de reconhecimento da protease da furina dos seis aminoácidos (aminoácidos 427-432 da SEQ N° ID: 2) foi substituído por um substrato de PSA. Por exemplo, a variante da toxina de proaerolisina (PA) denominada PSA-PA 1 (SEQ N° ID: 3 e 4), inclui uma sequência de PA na qual o local de clivagem da furina foi substituído por um substrato de PSA HSSKLQ (SEQ N° ID: 5).

O PCR recombinante foi usado para substituir o local da furina de aerolisina (aminoácidos 427-432 da SEQ N° ID: 2) por um local de clivagem específico de PSA (SEQ N° ID: 5, 8, 11 ou 14) usando métodos anteriormente descritos (Vallette *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:723-33, 1988). Resumidamente, o PCR recombinante foi executado num volume final de 50 µl que continha 0,2 mM desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 0,5 µM de iniciadores dianteiro e reverso, 0,1 µg de DNA modelo (template) e 2,5 unidades de polimerase pfu clonada em pfu tampão da reacção [20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, e 0,1 mg/ml BSA].

O rastreio de células transformadas para inserção da proaerolisina foi executado por PCR usando polimerase *Taq*. Foi preparado um cocktail em tampão de reacção de PCR [50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) e 10 mM Tris-HCl (pH 9,0)] contendo 0,2 mM dNTP, 0,5 µM de iniciadores dianteiro e reverso e 5 unidades de polimerase *Taq*. Amostras de 10 µl deste cocktail foram aliquotadas em tubos de 0,2 ml e foram adicionadas células transformadas usando estiletes esterilizados.

Os produtos de PCR finais foram digeridos usando enzimas de restrição adequados, e depois ligados no vector de clonagem pTZ18u (BioRad) para amplificação. Resumidamente, as digestões de restrição decorreram a 37°C durante 90 minutos em tampão Pharmacia One-Phor-All [10 mM Tris-acetato (pH 7,5), 10 mM Mg-acetato, e 50 mM K-acetato] contendo cerca de uma unidade de enzima de restrição por cada µg de DNA. A inserção resultante, e o DNA vector pTZ1 8u, foram misturados conjuntamente num rácio aproximado de 5:1 e aquecidos a 45°C durante 15 minutos. Subsequentemente, as amostras foram diluídas em solução tampão One-Phor All e acrescentado ATP para uma concentração final de 1 mM para ligações de extremidade coesiva ou 0,5 mM para ligações de extremidade plana. De seguida, foram acrescentadas 11 unidades de T4 DNA ligase a cada amostra e amostras foram agitadas suavemente. As ligações foram feitas a 13°C durante 4 horas (ligações de extremidade coesiva) ou 16 horas (ligações de extremidade plana).

Procedeu-se ao sequenciamento do DNA para assegurar que se faziam as substituições correctas. A inserção foi subsequentemente isolada do vector de clivagem e subclonado no plasmídeo com largo espectro de hospedeiros pMMB66HE (Furste *et al.*, *Gene* 48:119-131, 1986) para expressão em *E. coli*. Células DH5a de *E. coli* foram tornadas competentes usando o método de lavagem de CaCl_2 anteriormente descrito (Cohen *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110-4, 1972). Células na fase log ($\text{OD}_{600} = 0,4 - 0,7$) foram recolhidas por centrifugação e lavadas em 1/4 de volume de 100 mM MgCl_2 frio. As células foram de novo granuladas, e resuspensas em 2 volumes de 100 mM CaCl_2 frio. As células foram de seguida incubadas em gelo durante 45 minutos aproximadamente. As células foram então centrifugadas e resuspensas em 1/10 de volume de 100 mM CaCl_2 . A incubação prosseguiu durante mais 45 minutos antes da adição de glicerol para uma concentração final de 15%. As células competentes foram armazenadas a -70°C até utilização.

A transformação de plasmídeos recombinantes em células de *E. coli* competentes decorreu segundo a método de Inoue *et al.* (*Gene* 96: 23-8, 1990). As células competentes (alíquotas de 200 µl) foram incubadas com 0,5 - 10 ng de DNA durante 1 hora em gelo. As células foram então submetidas a um choque térmico a 42°C durante 4 minutos. As células foram rapidamente transferidas de volta para o gelo durante 5 minutos. Subsequentemente, adicionaram-se 500 µl de meio LB a cada amostra e as células foram incubadas durante 1 hora a 37°C com agitação moderada. Alíquotas (150 µl) foram colocadas em agar LB em placas contendo 50 µg/ml de ampicilina. Estas placas foram incubadas ON a 37°C.

Os clones de pMMB66HE recombinante foram transferidos para a estirpe CB3 de *Aeromonas salmonicida* (ver Buckley, *Biochem. Cell. Biol.* 68:221-4, 1990) por conjugação usando a técnica de acoplamento de filtros de Harayama *et al.* (*Mol. Gen. Genet.* 180:47-56, 1980). O uso desta estirpe de *A. salmonicida* deficitária de protease resultou na produção de variantes de proaerolisina não contaminadas por aerolisina activada e resultou na produção de grandes quantidades de proteína. A proteína final de proaerolisina foi purificada por cromatografia em hidroxapatita e cromatografia de permuta iónica como anteriormente descrito (Buckley, *Biochem. Cell. Biol.* 68:221-4, 1990). Deste método resultaram preparações de proteínas da proaerolisina idênticas de lote para lote.

EXEMPLO 2

Lise específica *in vitro* por PSA-PA1 de células produtoras de PSA

Este exemplo descreve métodos usados para determinar a especificidade das variantes de proaerolisina descritas no Exemplo 1. Tais métodos podem ser usados para testar a

especificidade de qualquer variante de proaerolisina que inclua um local de clivagem específico de PSA.

A toxina PSA-PA 1 foi testada contra células LNCaP produtoras de PSA (American Type Culture Collection, Manassas, VA) e células TSU não produtoras de PSA (Dr. T. Itzumi, Teikyo University, Japão). As células foram incubadas na presença de 10^{-12} M a 10^{-6} M de toxina durante 24 horas. Subsequentemente, as células foram contadas e classificadas em relação à percentagem de células viáveis com base na capacidade de exclusão de azul Tripán. Foi determinada a concentração necessária para matar 50% de células (IC_{50}) para a toxina contra as duas linhagens LNCaP e TSU.

A LD_{50} para PSA-PA1 contra células produtoras de PSA foi de 10^{-10} M. Em contrapartida, contra células TSU não produtoras de PSA a LD_{50} foi de $\sim 5 \times 10^{-8}$ M. Este resultado demonstra que a toxina PSA-PA 1 é especificamente activada por PSA como evidenciado pela diferença de toxicidade de 500 vezes entre linhagens de células humanas cancerígenas produtoras de PSA *versus* não produtoras de PSA.

EXEMPLO 3

PSA-PA1 não é activada em sangue contendo PSA

As variantes divulgadas de péptidos da proaerolisina específicos da próstata e activados por protease, tais como os descritos no Exemplo 1, podem ser injectados intraprostáticamente (ou intratumoralmente) como terapia local para o cancro da próstata. A toxina pode também ser injectada por via intravenosa (ou intramuscular) como terapia sistémica para cancro da próstata metastático. As variantes da molécula de PA que incluem um local de PSA não devem ser activadas no sangue, porque o PSA está enzimaticamente inactivado no sangue devido à presença de um grande excesso molar de inibidores de

serina protease tais como α_1 -antiquimotripsina e α_2 -macroglobulina.

Para testar a activação não específica de PSA-PA1 por outras serinas protease e PSA no soro humano, foi executado o seguinte ensaio de hemólise sensível. Adicionaram-se glóbulos vermelhos (RBC, de "red blood cell", 2% v/v) a plasma ou solução tampão contendo toxina PSA-PA 1 \pm PSA. A extensão da hemólise foi testada medindo a libertação de hemoglobina para o sobrenadante. A adição de 0,1% de Triton resulta em 100% de hemólise em alguns segundos e foi usada como controlo positivo. A quantidade de hidrólise exprimiou-se como um rácio entre a absorvância da amostra a 540 nm e a absorvância da amostra tratada com Triton. A pré-incubação da toxina PSA-PA 1 (10^{-8} M) com PSA unicamente em solução tampão aquosa durante 1 hora antes de adicionar os RBC resultou numa hemólise de \sim 45% (FIG. 2).

Para determinar se a PSA-PA 1 se activa no plasma humano, a toxina PSA-PA 1 (10^{-8} M) foi incubada em plasma humano a 50% durante 1 hora. Numa experiência associada, começou por se adicionar excesso de PSA (10.000 ng/ml) ao plasma humano, que se deixou incubar várias horas. O plasma contendo PSA-PA1 \pm PSA foi então incubado com RBC humano (2% v/v). A adição de PSA-PA 1 ao plasma humano, ou plasma humano marcado com elevada concentração de PSA, não resultou em qualquer hemólise apreciável (ou seja, $<1\%$ do controlo de Triton) (FIG. 2). Estes resultados demonstram que é possível administrar PSA-PA1 sistemicamente sem qualquer activação significativa no sangue, mesmo que o sangue contenha PSA mensurável.

EXEMPLO 4

Toxicidade *in vitro* e *in vivo* de variantes da proaerolisina

Este exemplo descreve métodos usados para determinar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* das variantes de proaerolisina modificadas divulgadas. Tais métodos podem ser usados para medir a toxicidade de qualquer proteína de variante de proaerolisina clivável por protease específica da próstata.

Para determinar a toxicidade *in vitro*, executou-se o seguinte ensaio de viabilidade celular. Células de linfoma células-T de rato E14 (ATCC TIB-39) foram cultivadas em 10^{+5} células por poço em MTS/PMS Cell Titer 96 (Promega). Foram adicionadas variantes de proaerolisina a 1×10^{-13} M- 1×10^{-7} M como se mostra na FIG. 3, e incubadas com as células durante 4 horas a 37°C . A viabilidade celular foi subsequentemente determinada por leitura da placa num leitor de placa, seguindo as indicações do fabricante do kit de MTS/PMS. Como se vê na FIG. 3, as variantes da proaerolisina são menos tóxicas do que a proaerolisina de tipo selvagem, com um LC_{50} de 4×10^{-9} (PSA-PA 1), 1×10^{-9} (PSA-1K), e 1×10^{-7} (PSA-PA2), em contraste com um LC_{50} de $1,5 \times 10^{-10}$ para o tipo selvagem.

Para determinar a toxicidade *in vivo*, as variantes de proaerolisina foram administrados a ratos por via intravenosa. A proaerolisina de tipo selvagem (SEQ N° ID: 2) revelou-se altamente tóxica para os ratos; uma dose de $1 \mu\text{g}$ provocou a morte decorrida uma hora e a LD_{100} a 24 horas (ou seja, a dose que mata 100% dos animais decorridas 24 horas) na sequência de uma única injeção IV foi de $0,1 \mu\text{g}$. Em contraste, a LD_{100} de PSA-PA1 (SEQ N° ID: 4) nas 24 horas pós injeção foi 25 vezes superior (ou seja, dose total de $2,5 \mu\text{g}$).

EXEMPLO 5

PSA-PA1 reduz volume de células tumorais secretoras de PSA

Com base nos dados de toxicidade descritos no Exemplo 4, a uma série de ratos portadores de LNCaP (xeno enxertos de cancro da próstata de LNCaP humanos que produzem PSA) e a uma série de ratos portadores de SN12C (ratos de controlo com um xeno enxerto de carcinoma renal humano que não produz PSA) foi administrada uma única injeção intratumoral de 100 µl de 0,25 - 25 µg PSA-PA1 (0,1-10 vezes a dose LD₁₀₀). 48 horas após a injeção, os tumores foram recolhidos, fixados e corados com H&E, e para Ki-67 (índice proliferativo) e Tunel (índice apoptótico). A percentagem de tumor dentro da amostra foi determinada calculando o rácio entre as áreas de tumor viável e de tumor total na sequência da análise de imagens de finas secções do tumor.

Como se mostra na FIG. 4, a administração de 2,5 -25 µg de PSA-PA 1, reduz o volume das células tumorais de 85-99%, enquanto uma redução <20% foi observada a 0,25 µg de PSA-PA 1. Em contrapartida, quando os ratos portadores de xeno enxertos de carcinoma renal humano SN12C não produtores de PSA (células apresentadas pelo Dr. Isaiah Fidler Anderson Cancer Center, Houston TX), foram injectados por via intratumoral com PSA-PA 1, não se observou qualquer redução significativa (ou seja, <25%) na percentagem de tumor viável no mesmo intervalo de doses (FIG. 4).

Em tumores de controlo (ratos SN12C), o índice proliferativo foi de ~ 40% decorridas 48 horas sobre a administração intratumoral de PSA-PA 1. Em contrapartida, nos tumores que responderam ao tratamento com PSA-PA 1, a percentagem de células positivas de Ki-67 foi <1% em 48 horas. Adicionalmente, nos tumores de controlo o índice apoptótico foi <1% decorridas 48 horas sobre a administração intratumoral de PSA-PA 1, enquanto nos tumores tratados com PSA-PA1 todas

as células eram positivas às 48 horas (ou seja, índice apoptótico >99%).

Estes resultados demonstram que a toxina PSA-PA 1 mata eficiente e rapidamente as células produtoras de PSA e esta citotoxicidade *in vivo* é específica e depende da presença de PSA existente no fluido extracelular dos tumores.

EXEMPLO 6

Direccionar a protoxina através de domínios de ligação específicos da próstata

Este exemplo descreve métodos para produzir e utilizar variantes de toxinas da proaerolisina específicas da próstata activadas por protease nas quais o domínio de ligação da PA de tipo selvagem (ou original) (aproximadamente os aminoácidos 1-83 da SEQ N° ID: 2) é funcionalmente substituído por um domínio de ligação específico do tecido prostático, tal como o péptido LHRH. O domínio de ligação original da PA pode ser funcionalmente suprimido por qualquer método conhecido na especialidade, por exemplo por deleção dos aminoácidos 1-83 da SEQ N° ID: 2 (ou fragmentos dos mesmos, tais como 45-66), ou por inserção de mutações que diminuem a capacidade da PA se concentrar em membranas celulares.

O domínio de ligação da proteína N-terminal âncora de GPI da PA (aproximadamente os aminoácidos 1-83 da SEQ N° ID: 2) pode ser funcionalmente suprimido (por exemplo, por deleção dos aminoácidos 1-83 ou por inserção de mutações que tornam o domínio não funcional) sem afectar significativamente a formação de poros. Contudo, é necessário um domínio de ligação para concentrar a toxina na membrana celular. As proteínas mutantes às quais falta o domínio de ligação são citolíticas, mas apenas quando as células estão expostas a concentrações de toxinas significativamente superiores. A maior parte da toxicidade *in vivo* da PA de tipo selvagem e da variante

activada por PSA descrita acima no Exemplo 4 deve-se à ligação não específica de proteínas de âncora de GPA expressa pela maior parte das células de mamíferos. Para produzir uma protoxina mais específica e menos tóxica sistemicamente, o domínio de ligação não específica da proteína de âncora de GPI da proaerolisina pode ser funcionalmente suprimido e substituído por um domínio de ligação específico do tecido prostático.

Anticorpos

Um exemplo de meio ligante que pode ser usado para identificar uma proteína da proaerolisina modificada com alta especificidade para o tecido prostático é uma proteína de fusão que inclui um anticorpo de cadeia singular para a proteína da membrana específica da próstata, e anticorpos que reconhecem domínio de PSMA ou LHRH fundido nos domínios da toxina. De um ponto de vista ideal, a fixação do anticorpo a uma molécula de PA modificada não interfere significativamente com a capacidade da molécula para se ligar a, e concentrar numa, membrana celular, resultando na morte da célula. Os anticorpos podem fixar-se aos terminais N- ou C- de uma PA modificada usando métodos de fusão de genes bem conhecidos na especialidade (ver, por exemplo, Debinski and Pastan, *Clin. Cancer Res.* 1:1015-22, 1995). O anticorpo pode, por exemplo, substituir o lobo pequeno original de proaerolisina (aminoácidos 1-83 da SEQ N° ID: 2), ou o anticorpo pode ser adicionado à molécula da PA com mutações no domínio de ligação original. Uma tal proaerolisina modificada pode também incluir uma sequência de activação de PSA para aumentar a especificidade. Num exemplo, o anticorpo é um anticorpo de cadeia singular para PSMA fundido nos domínios da toxina de PA.

Em alternativa, os anticorpos ou fragmentos de FAB podem fixar-se a uma PA modificada por reticulação covalente (ver, por exemplo, Woo *et al.*, *Arch. Pharm. Res.* 22(5):459-63, 1999

e Debinski and Pastan, *Clin. Cancer Res.* 1(9): 1015-22, 1995). A reticulação pode ser não específica, usando por exemplo um agente reticulante homobifuncional reactivo da lisina, ou pode ser específico, usando por exemplo um agente reticulante que reage com grupos amino no anticorpo e com cisteína localizada na variante de proaerolisina (tais como aminoácidos Cys19, Cys75, Cys159, e/ou Cys164 da SEQ N° ID: 2).

Ligandos

Outros meios ligantes que podem ser usados são pequenos ligandos péptidos que se ligam ao seu receptor correlacionado expresso na membrana das células prostáticas cancerígenas. Entre vários exemplos podemos referir a hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH) de origem natural e sintética, péptidos agonistas (ver, por exemplo, Genbank Accession N°. CAA25526 e SEQ N° ID: 22 e 23), que se ligam com elevada afinidade a receptores de LHRH, e péptidos que se podem ligar selectivamente a PMSA. Os receptores de LHRH são expressos por uma elevada percentagem de cancros prostáticos humanos, mas não por células hematopoiéticas. Esta expressão diferencial é responsável pela especificidade ligante.

É conhecido que alguns resíduos de LHRH, tais como o Gly na 6^a posição (Gly6), podem ser substituídos sem comprometer a afinidade ligante do receptor (Janaky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:972-6, 1992; Nechushtan *et al.* *J. Biol. Chem.*, 272:11597-603, 1997). Por conseguinte, pode ser produzida uma toxina de variante da PA (na qual o domínio de ligação original é funcionalmente suprimido) a qual estabelece uma ligação covalente com a LHRH D-Lys6 purificada (na amina épsilon desta lisina).

LHRH D-Lys6 (SEQ N° ID: 23) pode fixar-se a várias porções de uma proteína de proaerolisina modificada com um domínio de ligação suprimido funcionalmente. Idealmente, contudo, tal colocação não interfere significativamente com a capacidade da

toxina se inserir na membrana para formar um poro. Por exemplo, a amina épsilon do análogo de D-Lys6 pode ligar-se ao terminal amino da proaerolisina modificada por via de um ligante de ácido dicarboxílico. A clivagem pela furina ou uma protease específica da próstata (dependendo de qual o local de clivagem que está presente no péptido da proaerolisina) resulta na libertação da fracção inibidora do terminal C- enquanto a toxina permanece ligada ao receptor LHRH.

Em alternativa ou adicionalmente, a amina épsilon do análogo D-Lys6 de LHRH pode ligar-se directamente ao carboxilo do terminal C- da proaerolisina modificada à qual falta um domínio de ligação de tipo selvagem funcional, pela adição de um Cys ao terminal C- da PA modificada, reticulando depois este Cys à amina épsilon do análogo D-Lys6 de LHRH. Esta ligação produz uma proteína de PA derivada na qual o péptido de LHRH se fixa ao domínio inibidor do terminal C- de PA. A clivagem pela furina ou por uma protease específica da próstata, tal como PSA, liberta a toxina e deixa o fragmento inibidor ligado ao receptor de LHRH. Por conseguinte, a formação de poros não deve ser inibida pela firme ligação ao receptor. Além disto, é possível produzir proteínas de fusão recombinante nas quais péptidos de LHRH modificada se fundem nos terminais N- e C- da toxina de PA modificada à qual falta um domínio de ligação original funcional.

Noutros exemplos, um resíduo de cisteína é introduzido na 6ª posição do péptido de LHRH e o péptido fixa-se às toxinas da PA modificada por via de uma ponte dissulfureto, por exemplo nos aminoácidos 215 e/ou 300 da SEQ N° ID: 2, na qual os aminoácidos 215 e/ou 300 sofreram uma mutação para uma cisteína. Num outro exemplo, é produzida uma proteína recombinante na qual o péptido de LHRH se funde nos terminais amino da toxina de PA modificada.

As proteínas da proaerolisina modificada resultantes as quais incluem um domínio de ligação específico do tecido prostático

funcionalmente substituído para o domínio de ligação da PA original, são testadas *in vitro* e *in vivo* em termos de especificidade de ligação e activação de toxinas, usando os métodos descritos nos Exemplos 1-5.

Para demonstrar que domínios de ligação específicos do tecido prostático, tais como LHRH ou PSMA, podem ser funcionalmente substituídos pelo domínio de ligação da PA original, façam-se as seguintes experiências. Os métodos abaixo enumerados descrevem o uso de uma molécula na qual o domínio de ligação da PA original foi suprimido, e a LHRH ligada à proaerolisina resultante. Todavia, é possível usar métodos similares para testar qualquer variante da molécula de PA, tais como moléculas nas quais se usam outros domínios de ligação específicos do tecido prostático, e onde o domínio de ligação da PA sofre uma mutação (por exemplo, pela inserção de uma ou mais das seguintes mutações: W45A, I47E, M57A, Y61A, K66Q, e W324A) em vez de uma deleção.

São produzidas proteínas de LHRH-proaerolisina contendo a sequência de activação original de furina da PA. Compara-se a especificidade de ligação destas toxinas às células positivas (LNCaP) e negativas (TSU) do receptor de LHRH usando métodos descritos no Exemplo 2. Ambas as linhagens celulares activam a PA de tipo selvagem, contendo um local de activação da furina. Por conseguinte, enquanto cada linhagem pode activar as proteínas de LHRH-proaerolisina, o péptido ideal é aquele que é tóxico a baixas concentrações para as células positivas do receptor de LHRH. Usando estes métodos, são identificadas regiões da proaerolisina às quais o péptido de LHRH se pode fixar sem interferir com a formação de canais pela toxina.

Para demonstrar que as proteínas de LHRH-proaerolisina se ligam ao receptor de LHRH e são activadas por PSA, produzem-se toxinas que contêm um local de activação por PSA em vez do local de furina usando os métodos descritos no Exemplo 1. A activação destas toxinas por células LNCaP produtoras de PSA,

LHRH positivo, é comparada com a activação por células TSU não produtoras de PSA LHRH receptor negative, usando os métodos descritos no Exemplo 2.

As toxinas de proaerolisina activada por LHRH-PSA são testadas *in vivo* para demonstrar que a introdução do meio ligante de LHRH resulta na diminuição da toxicidade não específica e no aumento da capacidade de direccionamento. Como se descreve acima, determina-se a LD₁₀₀ destas toxinas na sequência de uma única injeção intravenosa e compara-se com a correspondente toxina não contendo LHRH, activada por PSA, usando os métodos descritos no Exemplo 4. Subsequentemente, a toxina é administrada em doses variáveis, tais como 0,1 µg a 1 mg, por via intravenosa a animais portadores de LNCaP para demonstrar que se observa um efeito anti-tumoral melhorado em doses da toxina mais elevadas e menos tóxicas.

EXEMPLO 7

Determinação da antigenicidade da proaerolisina

Este exemplo apresenta métodos para determinar se os péptidos da proaerolisina modificada aqui divulgados são antigénicos. Adicionalmente, divulgam-se métodos para reduzir a antigenicidade potencial.

Como se descreve nos Exemplos acima, a injeção intratumoral de PSA-PA1 (SEQ N° ID: 4) demonstra a utilidade da toxina como terapia para o cancro da próstata localizado por via de injeção intraprostática. Contudo, uma tal terapia pode também ser administrada por outras vias, como por exemplo intravenosa (iv), intramuscular, oral, etc., como terapia sistémica para o cancro da próstata metastático. Contudo, a administração sistémica das variantes de péptidos da PA aqui divulgadas pode resultar no desenvolvimento de uma resposta de anticorpos de neutralização susceptível de limitar dosagens repetidas.

A cinética e a magnitude da resposta dos anticorpos a qualquer uma das variantes de PA aqui divulgadas podem ser determinadas como segue. Por exemplo, a resposta antigénica a PSA-PA 1 (SEQ N° ID: 4) pode ser determinada em ratos imunocompetentes, para desenvolver um regime de dosagem que possa ser utilizado num humano imunocompetente. A ratos imunocompetentes (C57-BL6) são administradas doses iv de PSA-PA1 (SEQ N° ID: 5) quer diariamente x 5 que semanalmente x 3 num intervalo de dosagem entre 0,1 µg e 5 µg. Os ratos foram sacrificados em intervalos variáveis (por exemplo, na sequência de uma dose única, na sequência de doses múltiplas) sendo obtido soro. Pode recorrer-se a um ensaio baseado no ELISA para detectar a presença de anticorpos anti-proaerolisina. Neste ensaio, uma quantidade definida de proaerolisina é fixada à superfície de polistireno em placas de 96 poços. Subsequente ao bloqueio com seroalbumina bovina (BSA, de "bovine serum albumin"), acrescenta-se aos poços soro de ratos exposto à proaerolisina em diluições variáveis. Após um período de tempo definido para

a incubação, os poços são lavados, e adiciona-se um anticorpo secundário de cabra-anti-rato conjugado com fosfatase alcalina, seguido de um substrato. Determina-se a quantidade de anticorpo presente medindo a absorvância num espectrofotómetro, o que permite determinar a evolução temporal e a magnitude da resposta do anticorpo fazendo variar os programas e as doses de PSA-PA 1 iv.

Para diminuir a antigenicidade da proaerolisina, o domínio de ligação original pode ser funcionalmente suprimido e substituído, por exemplo, por LHRH, como se descreve no Exemplo 6. A antigenicidade de tais péptidos pode ser determinada na sequência da exposição a programas variáveis de proteínas de LHRH-proaerolisina às quais faltam porções do domínio de ligação original usando os métodos acima descritos. Um outro método que se pode utilizar para permitir o tratamento continuado com toxinas específicas da próstata e activadas por protease consiste em usar toxinas líticas alternativas com antigenicidade não sobreposta (ver Exemplo 10). Um exemplo consiste em usar uma toxina bacteriana modificada, estruturalmente relacionada, como a alfa toxina *Clostridium septicum* que também pode ser activada por uma protease específica da próstata, como PSA, mas que não é reconhecida ou neutralizada por anticorpos que reconhecem a PA (ver Exemplo 10). Um outro exemplo consiste em usar uma toxina formadora de poros produzida por tecidos humanos, tal como perforina humana produzida por células T humanas citolíticas. As perforinas modificadas nas quais a sequência de activação de tipo selvagem é substituída por péptidos que são substratos para proteases específicas da próstata, tais como PSA, podem ser administradas e não produzir uma resposta de anticorpos pelo facto de as proteínas serem de origem humana.

Adicionalmente, apresentam-se métodos para determinar se o anticorpo produzido pode neutralizar as propriedades citolíticas da aerolisina. Uma PA modificada divulgada (tal

como SEQ N° ID: 4, 24 e 25) é incubada com PSA para activar a toxina. A toxina activada é incubada soro contendo anticorpos em doses variáveis. Adicionam-se RBC lavados para determinar o grau de hemólise *versus* controlo (toxina não exposta a soro) como se descreve no Exemplo 2.

Adicionalmente, animais portadores de tumor produtor de PSA podem ser inoculados duas vezes com toxinas de proaerolisina activada por PSA, e depois inoculado de novo com uma dose letal de toxina (ver Exemplo 4) para determinar se o anticorpo neutraliza a toxicidade *in vivo*. Subsequentemente, avalia-se a resposta antitumoral que se segue à injeccão intratumoral de animais vacinados, para determinar se os anticorpos neutralizam a toxina quando injectados intratumoralmente.

EXEMPLO 8

Indução de uma resposta imunoestimulante sistémica

Este exemplo apresenta métodos que podem ser usados para demonstrar que a lise celular mediada pela proaerolisina produz um efeito imunoestimulante sistémico. Um tal efeito imunoestimulante sistémico resultante de uma administração intraprostática das toxinas aqui divulgadas pode constituir uma terapia local para o cancro prostático no interior da próstata, induzindo simultaneamente um efeito antitumoral sistémico contra uma doença micrometastática oculta. Em alternativa ou adicionalmente, os sujeitos podem ser vacinados com células prostáticas cancerígenas lisadas pelas proaerolisina modificada na presença ou na ausência de citoquinas, como GMCSF, para tratar uma doença metastática inicial ou recorrente.

Administração de células prostáticas tumorais lisadas com proaerolisina modificada

Para demonstrar que células tratadas com proaerolisina modificada estimulam uma resposta imunitária sistémica num sujeito, é possível usar os seguintes métodos. Resumidamente, a sujeitos (tais como ratos ou um sujeito humano imunocompetente com cancro da próstata) são administradas células prostáticas tumorais (tais como células prostáticas tumorais de rato TC2, células prostáticas cancerígenas obtidas do sujeito com cancro da próstata, e/ou linhagens de células prostáticas humanas cancerígenas para administração a doentes) as quais foram lisadas com uma ou mais moléculas modificadas de proaerolisina aqui divulgadas. Para determinar se ocorre ou não uma resposta imunitária sistémica, ratos administrados com células prostáticas cancerígenas lisadas podem ser inoculados de novo com as mesmas células sendo medido o crescimento destas células tumorais inoculadas. Por exemplo, os ratos C57-BL6 foram injectados subcutaneamente com células TC2 lisadas de proaerolisina. Para o conseguir, 10^7 células TC2 são lisadas por incubação com proaerolisina durante 1 hora a 37°C em solução salina tamponada de fosfato (PBS) esterilizada. Aos animais são administradas duas injeções por semana deste lisado celular para estimular uma resposta imunitária às células TC2. Os animais são subsequentemente inoculados de novo com uma injeção subcutânea de células cancerígenas TC2 uma semana após a segunda inoculação de lisado. TC2 é uma linhagem celular de cancro da próstata de rato derivada de tecido canceroso isolado de um rato TRAMP (Foster et al, *Cancer Res.* 57:3325-30, 1997). Os sujeitos de controlo recebem um número similar de células que foram lisadas por congelamento e descongelamento, ou tratadas com radiação para indução de apoptose. Um outro grupo de controlo recebe apenas o péptido de proaerolisina modificado. O crescimento do tumor é comparado entre os grupos usando os métodos descritos no Exemplo 5.

Para sujeitos humanos, as células prostáticas cancerígenas podem ser obtidas do doente no momento da prostatectomia ou

biopsia, ou é possível usar linhagens de células prostáticas cancerígenas. Exemplos de linhagens de células prostáticas cancerígenas de humanos incluem células LNCaP produtoras de PSA (como ATTC N°s. CRL-1740 e CRL-10995) ou CWR22R (ATCC N°. CRL-2505 e Nagabhushan *et al*, *Cancer Res.* 56(13):3042-6,1996), ou PC-3 não produtoras de PSA (ATCC N°. CRL-1435) e DU 145 (ATCC N°. HTB-81). Aproximadamente 10^7 - 10^8 células de ambas as origens (doente ou linhagens celulares) são incubadas com 1 μ g de PA (de tipo selvagem ou variante) durante 1 hora a 37°C em PBS esterilizado. O lisado resultante é cuidadosamente misturado com pipetagem vigorosa, e a suspensão é administrada a um sujeito por injeção subcutânea de ~0,5 ml. Os doentes podem ser tratados semanalmente com 3 doses. Os doentes são rigorosamente monitorizados com exames físicos semanais. A resposta imunitária à PA subcutânea pode ser monitorizada avaliando a presença de anticorpos para PSA, PSMA, e hK2, e avaliando a resposta às células B e T recorrendo a metodologia anteriormente descrita (Simons *et al.* *Cancer Res.* 59:5160-8, 1999).

Em alternativa ou adicionalmente, as células prostáticas cancerígenas de um doente ou as linhagens de células prostáticas cancerígenas fabricadas para exprimir proteínas imunoestimulantes (tais como GM-CSF) são incubadas com PA (de tipo selvagem ou variante) e usadas para produzir o lisado (ver, por exemplo, Simons *et al.* *Cancer Res.* 59:5160-8, 1999). As células prostáticas cancerígenas lisadas com PA podem ser co-administradas com células prostáticas cancerígenas irradiadas produzindo moléculas imunoestimulantes. A irradiação induz a apoptose nas células. É expectável que a combinação das células mortas por citólises e das células mortas por indução de apoptose produza efeitos imunoestimulantes superiores (Sauter *et al.* *J. Exp. Med.* 191:423-33, 2000). Num exemplo, a um sujeito são co-administradas células prostáticas cancerígenas lisadas com PA misturadas com proteína imunoestimulante. Num outro exemplo,

células prostáticas cancerígenas lisadas com PA são administradas subcutaneamente, e é sistemicamente administrada um proteína imunoestimulante, tal como GM-CSF, interleucinas, interferões, G-CSF (Dranoff *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3539-43, 1993)

Administração intraprostática de proaerolisina modificada

Um outro método que pode ser usado para estimular uma resposta imunitária sistémica num sujeito com cancro da próstata consiste em administrar as toxinas da proaerolisina modificada aqui divulgadas directamente na próstata do sujeito. Por exemplo, as toxinas da proaerolisina modificada podem ser administradas directamente na próstata (ou no próprio tumor) de um sujeito humano com um tumor prostático, ou em ratos ProHA transgénicos seguida de uma transferência adoptiva de células T preparadas com hemaglutinina (HA). É expectável que a citólise que se segue à injeção intraprostática das toxinas da proaerolisina modificada provoque uma resposta imunitária à HA na próstata dos ratos ProHA, ou aos antigénios do tumor prostático em humanos. Os ratos transgénicos ProHA expressam a proteína HÁ *influenza* sob o controlo do promotor de probasina restringido à próstata. Os ratos ProHA expressam HA apenas na próstata. Neste sistema, as células T específicas de CD4 e CD8 provenientes de ratos dadores separados são preparadas por exposição a HA e depois transferidos adoptivamente para o animal transgénico HA.

Aos sujeitos é administrada uma dose intraprostática subletal de proaerolisina modificada (por exemplo, definida usando os métodos descritos no Exemplo 4). Pelo facto de os ratos ProHA não produzirem PSA ou um homólogo equivalente do ponto de vista enzimático, usa-se a aerolisina de tipo selvagem. Aos humanos, contudo, administra-se uma ou mais das toxinas da proaerolisina modificada divulgada. 24 horas após a injeção intraprostática, alguns ratos são sacrificados sendo-lhes retirada a próstata e analisado o grau de necrose. Um segundo

grupo de ratos injectados recebe células T CD4 e CD8 específicas de HA, que foram colhidas de dadores transgénicos TCR inoculados com 10^9 pfu de hemaglutinina recombinante expressando o vírus *vaccinia* como anteriormente descrito (Staveley-O'Carroll *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1178-83, 1998). Estas células T são Thy 1.1+ e são transferidas para os ratos ProHA que são Thy 1.2+. Quatro dias após a transferência adoptiva para os ratos ProHA tratados com proaerolisina, os ratos receptores são sacrificados, e os nódulos de drenagem do baço, das axilas (irrelevantes) e da próstata são dissecados, dissociados e lavados.

Para avaliar a activação de células T específicas, podem executar-se os seguintes ensaios: Um milhão de células isoladas foram marcadas usando um anticorpo anti Thy 1.1 marcado com Ficoeritrina e anticorpo antiCD4 ou CD8 marcado com Cy-chrome (Pharmingen, San Diego, CA). As células isoladas são analisadas usando FacsScan (Becton Dickinson). O índice de expansão de células T específicas de HA é calculado dividindo a percentagem de células clonotípicas (Thy 1.1+) nos animais ProHA tratados pela percentagem de células clonotípicas numa localização de tecido idêntico em controlos de ProHA não tratados. Adicionalmente, a relação entre a percentagem de células clonotípicas nos nódulos de drenagem da próstata *versus* nódulos linfáticos irrelevantes permite obter um índice de proliferação específico da próstata subsequente ao tratamento de PA. Num outro ensaio, mede-se a proliferação específica de antígenos tal como descrito anteriormente (Adler *et al. J. Exp. Med.* 187:1555-64, 1998). Resumidamente, linfócitos ou esplenócitos HA agregados são incubados com péptido de HA de classe II (proliferação específica de células CD4) ou péptido de HA de classe I (proliferação específica de células CD8). As células são cultivadas durante três dias e depois pulsadas durante a noite com timidina tritiada seguida de colheita e determinação de contagens. Aumento de contagens

incorporadas em relação ao controlo significa activação de células T específicas.

As próstatas dos ratos ProHA tratados com PA que receberam HA specific Thy1.1 T cells são analisadas do seguinte modo. Secções fixas da próstata de ratos tratados são marcadas com anticorpo Thy 1.1 biotinilado (Pharmlingen) e contramarcados com estreptavidina peroxidase usando procedimentos imunohistoquímicos padrão. Para determinar a extensão da estimulação, compara-se o grau de marcação positiva com controlos tratados com soro fisiológico.

Para avaliar se a proaerolisina intraprostática pode influenciar o desenvolvimento, crescimento ou modelo de propagação subsequente do tumor, podem usar-se os seguintes métodos. A proaerolisina (ou os péptidos da proaerolisina modificada aqui divulgados) pode ser injectada na próstata de ratos TRAMP em diferentes momentos do ciclo de vida dos animais (pré-pubescente, pós-pubescente antes da doença metastática, com doença metastática). Os animais anestesiados são injectados intraprostáticamente em condições de esterilização. Em vários momentos subsequentes à inoculação intraprostática, os animais são sacrificados e é-lhes efectuada uma necropsia para avaliar a extensão do tumor. As próstatas são removidas e realiza-se uma análise imunohistoquímica para avaliar a presença de lesões precursoras e cancro da próstata explícito. De igual modo, animais TRAMP pré-pubescente podem receber duas vezes por via subcutânea células TC2 lisadas de proaerolisina ou tumores primários lisados de proaerolisina removidos de ratos TRAMP portadores de cancro em última fase. Estes animais são acompanhados e sacrificados em momentos definidos para avaliar a evolução temporal e a magnitude do desenvolvimento do tumor em comparação com os controlos.

Uma abordagem similar pode ser usada para administrar PA modificada a doentes com cancro da próstata localizado. Tal

terapia intraprostática de PA modificada pode ser usada como tratamento inicial para cancro da próstata localizado, só ou em combinação com radiação (feixe externo ou braquiterapia) e/ou terapia de ablação de androgénio. A terapia intraprostática de PA modificada pode também ser administrada a doentes que tenham falhado a terapia de radiação e sejam suspeitos de apenas terem uma recorrência local de cancro da próstata no interior da próstata. A terapia intraprostática de PA modificada pode também ser dada a doentes com cancro da próstata metastático e localizado para tratar directamente o cancro localizado e para tratar o cancro metastático por via da estimulação de uma resposta imunitária anti-tumoral sistémica.

Para produzir a terapia intraprostática de PA modificada, injecta-se a PA modificada na próstata de doentes em conformidade com um modelo predefinido similar ao usado para administrar a braquiterapia intraprostática. As técnicas e o equipamento necessários para a administração intraprostática são de igual modo similares aos que se usam na braquiterapia e foram objecto de descrição anterior (Deweese *et al*, *Cancer Res.* 61:7464-72, 2001). Para determinar a dose adequada a administrar intraprostáticamente, leva-se a efeito um ensaio clínico para determinar a posologia. Os doentes recebem múltiplas injeções (20-80) em locais predefinidos de modo a abranger toda a próstata. A dose total administrada de PA modificada varia entre cerca de 0,1 - 1,0 mg, e não mais de 10 mg no total. A dose por injeção é determinada dividindo a dose total pelo número total de injeções. Os doentes são tratados como doentes internos e monitorizados no hospital durante 48 horas após a injeção. Subsequentemente, os doentes são examinados semanalmente para detectar sinais de toxicidade. Pode usar-se MR1 da próstata para monitorizar o efeito directo do tratamento no tamanho da próstata. A resposta imunitária à PA intraprostática é monitorizada como

anteriormente descrito (Simons *et al. Cancer Res.* 59:5160-8,1999).

EXEMPLO 9

Locais de clivagem adicionais de PSA

São conhecidos locais de clivagem adicionais de PSA, com base no mapa de clivagem de PSA de proteínas seminais humanas semenogelina I e II, e num ensaio baseado numa membrana de celulose (ver Tabela 2 e Denmeade *et al., Cancer Res.*, 57:4924-30, 1997). Os locais de clivagem da PSA apresentados na Tabela 2 podem substituir o local de activação da protease furina de tipo selvagem da proaerolisina (aminoácidos 427-432 da SEQ N° ID: 2), usando os métodos descritos no Exemplo 1. Resumidamente, o PCR recombinante pode ser usado para substituir o local da furina de PA com um local de clivagem específico de PSA, como os que são apresentados nas Tabelas 1 e 2. A sequência de variantes de PA é subclonada na pMMB66HE para expressão em *E. coli*. Os clones recombinantes são transferidos para uma estirpe deficitária em protease de *A. salmonicida*, e a variante resultante de proteína de proaerolisina purificada por cromatografia em hidroxiapatita e cromatografia de permuta iónica.

Tabela 2. Cinética da hidrólise de PSA.

Substrato de PSA (SEQ N° ID)	K_m (uM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
KGISSQY (15)	160	0,043	270
SRKSQQY (16)	90	0,023	260
ATKSKQH (17)	1310	0,0091	6,9
KGLSSQC (18)	300	0,0017	5,6

LGGSSQL (19)	900	0,0037	4,1
EHSSKLQ (20)	1165	0,012	10,6
HSSKLQ (5)	470	0,011	23,6
SKLQ (21)	813	0,020	24,6

Os péptidos foram marcados com corante fluorescente (aminometil cumarina). Os ensaios foram executados em 50 mM Tris, 0,1 M NaCl, pH 7,8.

As sequências apresentadas na Tabela 2 incluem substratos que foram eficientemente, mas não especificamente, hidrolisados por PSA (KGISSQY; SEQ N° ID: 15) e SRKSQQY; SEQ N° ID: 16), e aqueles que não foram eficientemente, mas foram especificamente, hidrolisados por PSA (ATKSKQH; SEQ N° ID: 17 e LGGSSQL; SEQ N° ID: 19). As características destas toxinas modificadas podem ser comparadas com PSA-PA 1 contendo a sequência HSSKLQ (SEQ N° ID: 5). A título de controlo, foi produzida uma toxina modificada na qual o local de activação foi completamente suprimido (EX-PA).

Estas toxinas purificadas foram rastreadas para hidrólise de PSA usando o ensaio de hemólise descrito no Exemplo 3. A proaerolisina de tipo selvagem não está activada ou citolítica para eritrócitos. A activação da proaerolisina por proteases, contudo, dá origem a uma hemólise rápida. Resumidamente, para ensaiar a activação de PSA, foram incubadas concentrações variáveis de variantes purificadas de toxinas de PA com PSA durante 1 hora, lavadas, sendo-lhes adicionado soro isento de glóbulos vermelhos (RBC) (2% v/v). Decorrida mais 1 hora, as misturas da incubação são centrifugadas sendo determinada a absorvância do sobrenadante a 540 nm. Determina-se a concentração mínima de toxina modificada requerida para a lise de 50% de RBC para classificar as toxinas com base na eficiência da hidrólise de PSA.

Para determinar quer a activação por PSA quer a especificidade da activação, efectuam-se ensaios de citotoxicidade expondo

toxinas de proaerolisina PSA purificadas a linhagens de células produtoras de PSA (LNCaP) e não produtoras de PSA (TSU) *in vitro*, usando os métodos descritos no Exemplo 2. A concentração necessária para matar 50% das células (IC₅₀) pode ser determinada para cada toxina de variante de PA contra as linhagens de LNCaP e de TSU. As diferenças na citotoxicidade são usadas para classificar as toxinas activadas por PSA com base na especificidade.

As toxinas de variantes de PA podem também ser rastreadas *in vivo* em termos de actividade antitumoral por injeção intratumoral em xeno enxertos de LNCaP produtoras de PSA em ratos nus usando os métodos descritos no Exemplo 5. Como se descreve acima no Exemplo 5, a injeção intratumoral da toxina PSA-PA 1 diminui o tumor dentro de 48 horas. Em contrapartida, a proaerolisina, que é mais eficientemente activada pelas duas linhagens de células produtoras e não produtoras de PSA *in vitro*, teve um efeito mínimo contra xeno enxertos de LNCaP. Isto indica que a cinética da activação da toxina pode ser importante no efeito antitumoral global. A PSA-PA 1 é activada mais especificamente por PSA, mas a cinética da activação é mais lenta do que a da toxina de tipo selvagem. Isto pode permitir à PSA-PA 1 uma distribuição mais generalizada pelo tumor. Assim sendo, melhores substratos de PSA no local de activação, paradoxalmente, podem resultar numa diminuição do efeito antitumoral global *in vivo*.

Para avaliar a distribuição da proaerolisina activada por PSA versus PA de tipo selvagem intratumoralmente ou em tecido normal, podem usar-se proteínas PSA-PA 1 e PA com uma marcação fluorescente (como FITC). Xeno enxertos de LNCaP produtores de PSA são injectados com PSA-PA1 e PA com marcação fluorescente. Decorridas 24 horas sobre a injeção intratumoral, os tumores são colhidos, fixado e seccionados para análises ao microscópio. As proteínas de proaerolisina com marcação fluorescente que se inseriram nas membranas celulares são

retidas ao longo do processo de fixação. Estas lâminas são então analisadas usando um microscópio de fluorescência equipado com o conjunto adequado de filtros para determinar o grau de distribuição das toxinas de proaerolisina por todo o espécime tumoral.

Subsequentemente, toxinas de variantes de PA são injectadas em xeno enxertos de LNCaP, sendo a resposta antitumoral avaliada após 48 horas por medição do tumor, recorrendo aos métodos descritos no Exemplo 5. As toxinas de variantes de PA são classificadas com base no efeito antitumoral *in vivo* subsequente à injeção intratumoral. Adicionalmente, as toxinas de variantes de PA podem ser testadas quanto à toxicidade sistémica global por determinação da dose que mata 100% dos ratos (ou seja, LD₁₀₀) subsequente a uma única injeção intravenosa, usando os métodos descritos no Exemplo 4.

Usando estes métodos, são identificadas as toxinas de variantes de PA activadas por PSA que são mais eficiente e especificamente activadas por PSA, são as menos tóxicas sistemicamente e são as que produzem o efeito antitumoral *in vivo*, mais pronunciado. Tais toxinas de variantes de PA activadas por PSA podem também ser modificadas usando os métodos descritos no Exemplo 6.

EXEMPLO 10

Redução da antigenicidade de toxinas de proaerolisina modificada activada por PSA

Este exemplo descreve métodos adicionais que podem ser usados para produzir e caracterizar a antigenicidade e a

eficácia antitumoral de outras protoxinas activadas por proteases formadoras de poros modificadas.

Um método para ultrapassar a potencial antigenicidade das toxinas de variantes de PA divulgadas consiste em administrar protoxinas estruturalmente associadas que são de igual modo activadas por PSA, mas que não são reconhecidas por anticorpos de proaerolisina. Exemplos de tais protoxinas incluem, entre outras, a alfa toxina *Clostridium septicum* (Ballard et al., *Infect. Immun.* 63:340-4, 1995; Gordon et al. *J. Biol. Chem.* 274:27274-80, 1999; Genbank Accession N°. S75954), a delta toxina *Bacillus Thuringiensis* (Genbank Accession N°. D00117), e a perforina humana (Genbank Accession N°. NM005041). Embora mecanicamente similares à aerolisina, estas protoxinas apresentam diferentes sequências de péptidos de tal modo que os anticorpos específicos da proaerolisina não os reconhecem. Estas protoxinas foram clonadas, sendo produzidas formas recombinantes (Imagawa et al., *FEMS. Microbiol. Lett.* 17:287-92, 1994; Meza et al. *FEMS Microbiol. Lett.* 145:333-9, 1996).

Estas protoxinas, tal como a proaerolisina, contêm um péptido inibidor terminal C- que tem de ser removido por clivagem proteolítica para que a activação ocorra. O local de activação dentro de cada uma destas toxinas da proteína foi definido. Para a alfa toxina *Clostridium septicum*, o local de activação é um local de clivagem de furina (Gordon et al, *Infect. Immun.* 65:4130-4, 1997). O local de activação da delta toxina *Bacillus Thuringiensis* é clivado por proteases no mesentério de certos insectos (Miranda et al, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:1155-63, 2001). Para a perforina humana, a sequência de activação foi definida mas a protease de activação não foi ainda identificada (Uellner et al, *EMBOJ.* 16:7287-96, 1997).

O local de activação de cada uma destas protoxinas pode ser modificado para conter um local de clivagem de protease específico da próstata (como os locais de clivagem

apresentados nas Tabelas 1-2) usando os métodos descritos no Exemplo 1. Se desejado, o domínio de ligação da protoxina original pode ser funcionalmente suprimido e substituído por um domínio de ligação específico do tecido prostático, usando os métodos descritos no Exemplo 6. Em alternativa, o local de activação não é modificado, mas o domínio de ligação original é funcionalmente suprimido e substituído por um domínio de ligação específico de tecido prostático, usando os métodos descritos no Exemplo 6. Estas protoxinas modificadas são ensaiadas para activação de protease, usando por exemplo o ensaio de hemólise de RBC (Exemplo 3), para actividade *in vitro* contra linhagens de células produtoras de PSA e não produtoras de PSA (Exemplo 2) e estabilidade no soro humano (Exemplo 3). Se estas toxinas forem específica e eficientemente activadas por PSA, então são testadas *in vivo* quanto à actividade contra xeno enxertos produtores de PSA usando os métodos descritos no Exemplo 5. Adicionalmente, a cinética e a magnitude da produção de anticorpos é determinada usando os métodos descritos no Exemplo 7. O soro de animais tratados com cada toxina é rastreado para detecção de reactividade cruzada com cada um dos restantes membros da família de toxinas para definir o grau de reconhecimento cruzado.

Um outro método para reduzir a resposta imunitária sistémica consiste em administrar terapias imunossupressoras. Exemplos de terapias imunossupressoras incluem, entre outras, corticóides sistémicos ou tópicos (Suga *et al*, *Ann. Thorac. Surg.* 73:1092-7, 2002), ciclosporina A (Fang *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 6:1039-44, 1995), ciclofosfamida (Smith *et al*, *Gene Ther.* 3:496-502, 1996), deoxispergualina (Kaplan *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 8:1095-1104, 1997) e anticorpos para células T e/ou B [por exemplo, ligando anti-CD40, anticorpos anti CD4, anticorpo anti-CD20 (Rituximab)] (Manning *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 9:477-85,1998). Tais agentes podem ser administrados antes, durante ou após a administração de moléculas de PA

modificadas e/ou lisados de células produzidos por incubação com PA (de tipo selvagem ou variante).

EXEMPLO 11

Produção de variantes de sequências

No presente documento divulgam-se agentes e métodos para tratar o cancro da próstata por administração de um péptido de proaerolisina modificada que inclui um local de clivagem de protease específica da próstata. Os especialistas compreendem que o uso de outras sequências de proaerolisina, PSA, LHRH, e PSMA (como polimorfismos, fragmentos, ou variantes) é possível para praticar os métodos da presente divulgação, na condição de as características funcionais específicas da sequência serem mantidas. Por exemplo, as variantes de proaerolisina podem ser usadas para praticar os métodos aqui divulgados se mantiverem a sua capacidade de serem activadas por uma protease específica da próstata e formar poros nas membranas celulares, de que resulta a morte das células. Esta actividade pode ser facilmente determinada usando os ensaios aqui divulgados, por exemplo os descritos nos EXEMPLOS 2-5. Noutras configurações, as moléculas de proaerolisina modificadas possuem a característica de lisar especificamente células produtoras de PSA (por exemplo, a lise de células produtoras de PSA em maior extensão do que de células não produtoras de PSA).

A presente divulgação facilita o uso de moléculas de DNA, e deste modo de proteínas, derivadas de uma proteína original mas que diferem da sequência original na respectiva sequência precisa de nucleótidos ou aminoácidos. Tais variantes podem ser obtidas através de técnicas laboratoriais normais de biologia molecular e a informação da sequência aqui divulgada.

As moléculas de DNA e as sequências de nucleótidos resultantes de uma molécula de DNA original podem também se definir como sequências de DNA as quais hibridizam em condições rigorosas para as sequências de DNA divulgadas, ou fragmentos das mesmas. As condições de hibridização originam, em particular, graus de rigor variáveis consoante a natureza do método de hibridização e a composição e o comprimento do DNA de hibridização usado. Geralmente, a temperatura de hibridização e a força iónica (sobretudo a concentração de Na⁺) do tampão de hibridização determinam o rigor da hibridização. Os cálculos relativos às condições de hibridização necessárias para se alcançarem determinados níveis de rigor são analisados por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Capítulo 9 e 11), incluídos no presente a título de referência. A hibridização com uma sonda alvo marcada com [³²P]-dCTP é geralmente efectuada numa solução de elevada força iónica tal como 6xSSC a uma temperatura que está cerca de 5-25°C abaixo da temperatura de fusão, T_m. Um exemplo de condições rigorosas é constituído por uma concentração de sal próxima de pelo menos 0,01 a 1,0 M de concentração de ião Na (ou outros sais) a pH 7,0 a 8,3 e a uma temperatura próxima de pelo menos 30°C para sondas curtas (por exemplo, 10 a 50 nucleótidos). Condições rigorosas podem também ser obtidas com a adição de agentes desestabilizantes como formamida. A título de exemplo, condições de 5X SSPE (750 mM de NaCl, 50 mM de fosfato de Na, 5 mM de EDTA, pH 7,4) a 25-30°C são adequadas para hibridizações de sondas específicas de alelos.

A degeneração do código genético alarga ainda mais o âmbito da presente divulgação já que possibilita maiores variações na sequência de nucleótidos de uma molécula de DNA ao mesmo tempo que mantém a sequência de aminoácidos da proteína codificada. Por exemplo, o aminoácido Ala é codificado pelo códon triplo de nucleótidos GCT, GCG, GCC e GCA. Deste modo, a sequência de nucleótidos pode ser alterada sem afectar a composição de

aminoácidos da proteína codificada ou as características da proteína. Com base da degeneração do código genético, é possível obter variantes de moléculas de DNA a partir de moléculas de cDNA usando técnicas normais de mutagenese de DNA como se descreve acima, ou por síntese de sequências de DNA. As sequências de DNA que não hibridizam em condições rigorosas para as sequências de cDNA divulgadas em virtude da variação de sequências baseada na degeneração do código genético são também incluídas na presente divulgação.

Variantes, fragmentos, fusões, e polimorfismos de PA devem reter a capacidade para a lise de células produtoras de PSA, como determinado usando os ensaios divulgados no presente (por exemplo, ver Exemplos 2 e 5). As variantes e os fragmentos das sequências divulgadas retêm pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, ou mais da identidade das sequências para uma sequência de aminoácidos das proteínas e mantêm a actividade funcional da proteína como os especialistas conhecem.

EXEMPLO 12

Expressão recombinante de proteínas

Com o cDNA publicamente disponível e as correspondentes sequências de aminoácidos, bem como a presente divulgação de variantes, fragmentos e fusões de PA, a expressão e purificação de qualquer proteína por técnicas laboratoriais normais é possibilitada. A proteína purificada pode ser usada para terapia em doentes. Um especialista compreenderá que as toxinas de PA modificada divulgadas podem ser produzidas em qualquer célula ou organismo de interesse, e purificadas antes da administração a um sujeito.

Os métodos para produzir proteínas recombinantes são bem conhecidos na especialidade. Por conseguinte, o âmbito da presente divulgação inclui a expressão recombinante de

qualquer proteína. Ver, por exemplo, a Patente dos EUA N°: 5.342.764 de Johnson *et al*; Patente dos EUA N°: 5.846.819 de Pausch *et al*; Patente dos EUA N°: 5.876.969 de Fleer *et al*. e Sambrook *et al*. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Cap. 17

EXEMPLO 13

Modificações de péptidos

As proteínas de PA modificada que são activadas por uma protease específica da próstata, como o PSA, podem ser modificadas usando uma variedade de técnicas químicas para produzir derivados que possuem no essencial a mesma actividade como os péptidos modificados, e possuindo opcionalmente outras propriedades desejáveis (tais como menor antigenicidade). A título de exemplo, os grupos ácido carboxílico do péptido, com um terminal carboxilo ou uma cadeia lateral, podem ser apresentados na forma de um sal ou de um catião aceitável do ponto de vista farmacêutico ou esterificados para formar um éster C_1-C_{16} , ou convertidos numa amida de fórmula NR_1R_2 em que R_1 e R_2 são cada um independentemente H ou alquilo C_1-C_{16} , ou combinados para formar um anel heterocíclico, como um anel de 5- ou 6-membros. Os grupos amino do péptido, com um terminal amino ou uma cadeia lateral, pode ter a forma de um sal de adição ácida aceitável do ponto de vista farmacêutico, tal como os ácidos HCl, HBr, acético, benzóico, tolueno sulfónico, maleico, tartárico e outros sais orgânicos, ou pode ser modificado para alquil ou dialquilamina C_1-C_{16} ou ainda convertidos numa amida.

Os grupos hidroxilo da cadeia lateral do péptido podem ser convertidos em alcoxi C_1C_{16} ou num éster C_1C_{16} usando técnicas bem conhecidas. Os anéis fenilo e fenólico da cadeia lateral do péptido podem ser substituídos por um ou mais átomos de halogénio, tais como F, Cl, Br ou I, ou com alquilo C_1-C_{16} ,

alcoxi C₁-C₁₆, ácidos carboxílicos e ésteres do mesmo, ou amidas de tais ácidos carboxílicos. Os grupos metileno das cadeias laterais do péptido podem ser prolongadas para alquilenos C₂-C₄ homólogos. Os tióis podem ser protegidos com qualquer um dos vários grupos protectores bem conhecidos, tais como grupos acetamida. Os especialistas conhecem igualmente métodos para introduzir estruturas cíclicas nos péptidos aqui divulgados para seleccionar e definir restrições conformacionais para a estrutura de que resulta uma maior estabilidade. A título de exemplo, um resíduo de cisteína com terminal carboxilo ou terminal amina pode ser adicionado ao péptido, para que quando oxidado o péptido contenha uma ligação dissulfureto, gerando um péptido cíclico. Outros métodos de ciclização de péptidos incluem a formação de tioéteres e amidas com terminais carboxilo- e amino- e ésteres.

Para manter um péptido funcional, variantes particulares de péptidos diferem de um péptido de apenas um pequeno número de aminoácidos. Tais variantes podem apresentar deleções (por exemplo, de 1-3 ou mais aminoácidos), inserções (por exemplo, de 1-3 ou mais resíduos), ou substituições que não interferem com a desejada actividade do péptido. Variantes substitutivas são aquelas em que pelo menos um resíduo na sequência de aminoácidos foi removido sendo introduzido no seu lugar um resíduo diferente. Em configurações específicas, tais variantes possuem substituições de aminoácidos de resíduos singulares, por exemplo 1, 3, 5 ou mesmo 10 substituições numa proteína.

São igualmente divulgadas no presente configurações peptidornimético e organomimético, pela qual a disposição tridimensional dos constituintes químicos de tais péptido- e organorniméticos mimetizam a disposição tridimensional da estrutura principal do péptido e as cadeias laterais dos aminoácidos componentes no péptido, resultando em tais

péptido- e organorniméticos de uma toxina de PA modificada que possui a capacidade para lisar células produtoras de PSA. Para aplicações modeladas em computador, um farmacóforo constitui uma definição tridimensional idealizada dos requisitos estruturais para actividade biológica. Podem ser concebidos péptido- e organomiméticos adaptáveis a cada farmacóforo com software de modelação informática corrente (usando a técnica da concepção de medicamentos por computador ou CADD [de "computer assisted drug design"]). Consultar em Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs", in Klegerman & Groves, eds., 1993, Pharmaceutical Biotechnology, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, pp. 165-174 e Principles of Pharmacology (ed. Munson, 1995), Capítulo 102, uma descrição das técnicas usadas no CADD.

EXEMPLO 14

Métodos para expressar péptidos de proaerolisina modificada

Em alternativa (ou adicionalmente) à administração de um péptido de proaerolisina modificada para tratar o cancro da próstata, é possível obter um tratamento de longa duração ou sistémico (para, por exemplo, tratar ou evitar as metástases do tumor) expressando *in vivo* as toxinas da proaerolisina modificada divulgada.

A presente divulgação apresenta métodos de expressar um péptido de proaerolisina modificada numa célula ou num tecido *in vivo*. Num exemplo, a transfecção da célula ou do tecido ocorre *in vitro*. Neste exemplo, a célula ou o tecido (como um enxerto) é removido de um sujeito sendo depois transfectado com um vector de expressão que contém um cDNA que codifica a proteína relevante. As células transfectadas produzem proteína funcional e podem ser reintroduzidas no sujeito. Num outro exemplo, um ácido nucleico que codifica a proteína relevante é administrado a um sujeito directamente (por via intravenosa,

intratumoral ou intraprostática), e a transfecção ocorre in vivo.

Os péptidos da proaerolisina modificada e os métodos aqui divulgados podem ser usados para tratar um sujeito com um tumor prostático. Um tal método reduz o volume do tumor, e em algumas configurações, evita ou trata metástases do tumor prostático.

Os procedimentos científicos e médicos necessários para a transfecção das células humanas são hoje rotineiros. A disponibilidade pública de proaerolisina, domínios de ligação, e proteína de protease específica da próstata e sequências de cDNA permite o desenvolvimento da expressão genética in vivo em humanos (e outros mamíferos) com base nestes procedimentos. Adicionalmente, variantes específicas da molécula de proaerolisina são aqui divulgadas. A imunoterapia de doentes de melanoma recorrendo a linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) geneticamente fabricados foi reportada por Rosenberg *et al.* (*N. Engl. J. Med.* 323:570-8, 1990). Nesse estudo, usou-se um vector de retrovírus para introduzir nos TIL um gene de neomicina resistente. Uma abordagem similar pode ser usada para introduzir um péptido de proaerolisina modificada cDNA num sujeito com cancro da próstata.

Uma estratégia geral para transferir genes para células doadoras é divulgada na Patente dos EUA N° 5.529.774, aqui incluída a título de referência. Genericamente, um gene que codifica uma proteína com efeitos terapêuticos desejados é clonado num vector de expressão viral, e este vector é depois introduzido no organismo alvo. O vírus infecta as células, e produz a sequência da proteína in vivo, onde tem o seu efeito terapêutico desejado (Zabner *et al.* *Cell* 75:207-16, 1993).

Pode ser apenas necessário introduzir os elementos do DNA ou da proteína em certas células ou tecidos. Por exemplo, se o

sujeito tiver apenas um tumor da próstata, introduzir a proteína ou o DNA apenas na próstata (ou tumor) pode ser suficiente. Contudo, em alguns casos, pode ser mais eficaz e simples do ponto de vista terapêutico tratar todas as células de um sujeito, ou de uma forma mais abrangente disseminar o vector, por exemplo por administração intravascular (i.v.) ou oral. A título de exemplo, se um sujeito tiver um tumor da próstata metastizado, pode ser necessário introduzir sistemicamente a proteína ou o DNA.

A sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos um agente terapêutico, como um toxina de proaerolisina modificada, está sob controlo de um promotor adequado. Promotores adequados que podem ser usados incluem, entre outros, o promotor original do gene, promotor LTR retroviral, ou promotores adenovirais, tais como o promotor tardio principal do adenovírus; o promotor CMV; o promotor de RSV; promotores induzíveis, como o promotor de MMTV; o promotor de metalotioneína; promotores de choque térmico; o promotor de albumina; o promotor de histona; o promotor de α -actina; promotores de TK; promotores de parvovírus B19; e o promotor de ApoAI. Num exemplo, o promotor é um promotor específico da próstata, como um promotor de probasina. Contudo, a divulgação não está limitada a genes ou promotores estranhos específicos.

O ácido nucleico recombinante pode ser administrado a um sujeito por qualquer método que permite ao ácido nucleico recombinante atingir as células adequadas. Estes métodos incluem injeção, infusão, deposição, implantação ou administração tópica. As injeções podem ser intradérmicas ou subcutâneas. O ácido nucleico recombinante pode ser administrado como parte de um vector viral, tal como vírus avipox, vírus *vaccinia* recombinante, estirpes de adenovírus com deficiência de replicação ou poliovírus, ou sob uma forma não infecciosa como um DNA nu ou DNA encapsulado em lipossomas, como se descreve em detalhe no EXEMPLO 15.

EXEMPLO 15

Vectores virais para expressão genética *in vivo*

Os vectores adenovirais incluem essencialmente o genoma adenoviral completo (Shenk *et al.*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 11: 1-39, 1984). Em alternativa, o vector adenoviral é um vector adenoviral modificado no qual pelo menos uma porção do genoma adenoviral foi suprimida. Num exemplo, o vector inclui um ITR 5' adenoviral; um ITR 3' adenoviral; um sinal de encapsidação adenoviral; uma sequência de DNA codificadora de um agente terapêutico; e um promotor para expressar a sequência de DNA codificadora de um agente terapêutico. O vector está livre de pelo menos a maioria das sequência de DNA E1 e E3 adenovirais, mas não está necessariamente livre de todas as sequência de DNA E2 e E4, e das proteínas adenovirais codificadoras de sequências de DNA transcritas pelo promotor tardio principal do adenovírus. Noutro exemplo, o vector é um vírus adeno-associado (AAV) tal como descrito na Patente dos EUA N°.4.797.368 (Carter *et al.*) e em McLaughlin *et al.* (*J. Virol.* 62:1963-73, 1988) e AAV tipo 4 (Chiorini *et al.* *J. Virol.* 71:6823-33, 1997) e AAV tipo 5 (Chiorini *et al.* *J. Virol.* 73:1309-19, 1999).

Um tal vector pode ser construído em conformidade com as técnicas normais, usando um plasmídeo *shuttle* que contém, a partir da extremidade 5', um 5' ITR adenoviral, um sinal de encapsidação adenoviral, e uma sequência de reforço Ela; um promotor (que pode ser um promotor adenoviral ou um promotor estranho); uma sequência líder tripartida, um local de clonagem múltipla (que pode ser tal como aqui descrito); um sinal poli A; e um segmento de DNA que corresponde a um segmento do genoma adenoviral. O segmento de DNA serve como substrato para recombinação homóloga com modificação ou mutação de um adenovírus, e pode abranger, por exemplo, um segmento do genoma 5' do adenovírus a uma distância não

superior à base da 3329 até à base 6246. O plasmídeo pode também incluir um marcador seleccionável e uma origem de replicação. A origem de replicação pode ser uma origem bacteriana de replicação. Uma sequência de DNA desejada que codifica um agente terapêutico pode ser inserida no local de clonagem múltipla do plasmídeo

Exemplos de vectores que podem ser usados para praticar os métodos aqui divulgados incluem, entre outros, os divulgados em: WO 95/27512 de Woo *et al.*; WO 01/127303 de Walsh *et al.*; Patente dos EUA N°: 6.221.349 de Couto *et al.*; Patente dos EUA N°: 6.093.392 de High *et al.*

EXEMPLO 16

Geração e expressão de proteínas de fusão

Os métodos para produzir proteínas de fusão são bem conhecidos dos especialistas. A título de exemplo, a Patente dos EUA N°. 6.057.133 de Bauer *et al.* divulga métodos para proceder à fusão de moléculas constituídas por uma variante de interleucina-3 (hIL-3) humana ou proteínas mutantes funcionalmente ligada a um segundo factor de estimulação da colónia, citoquina, linfoquina, interleucina, factor de crescimento hematopoiético ou variante de IL-3. A Patente dos EUA N°. 6.072.041 de Davis *et al.* divulga a produção de proteínas de fusão que compreendem um molécula Fv de cadeia singular direccionada contra um receptor transcitótico ligado a uma proteína terapêutica por uma ligação covalente.

Podem ser usados métodos similares para produzir proteínas de fusão que compreendem PA (ou variantes, fragmentos, etc. da mesma) ligada a outras sequências de aminoácidos, tais como um domínio de ligação específico da próstata (por exemplo LHRH ou um anticorpo). Podem ser usadas regiões de ligação para espaçar as duas porções da proteína entre si e para criar

flexibilidade entre elas. A região de ligação é genericamente um péptido de comprimento compreendido entre 1 e 500 aminoácidos, com por exemplo menos de 30 aminoácidos de comprimento. A ligação que une as duas moléculas pode ser concebida para (1) permitir que as duas moléculas se dobrem e funcionem independentemente uma da outra, (2) não apresentar propensão para desenvolver uma estrutura secundária ordenada susceptível de interferir com domínios funcionais das duas proteínas, (3) apresentar uma característica hidrofóbica ou carregada mínima que possa interagir com os domínios funcionais da proteína, e (4) estabelecer uma separação estérica das duas regiões. Habitualmente, os aminoácidos da superfície nas regiões flexíveis da proteína incluem Gly, Asn e Ser. Outros aminoácidos neutros como Thr e Ala podem também ser usados na sequência de ligação. Podem ser incluídos aminoácidos adicionais na ligação pela adição de locais de restrição exclusivos na sequência de ligação para facilitar a construção das fusões. Podem também ser incluídos outros meios, se necessário. Estes podem incluir uma região ligante, tal como avidina ou um epítopo, tal como uma cauda de polihistidina, a qual pode ser útil para a purificação e o processamento da proteína de fusão. Adicionalmente, podem ser fixados marcadores detectáveis nas proteínas de fusão, para que a circulação da proteína de fusão por um organismo ou célula possa ser convenientemente monitorizada. Tais marcadores incluem radionuclídeos, enzimas, fluoróforos, e outros.

A fusão das sequências de ácido nucleico de PA (ou variante, fragmento, etc. da mesma), com a sequência de ácido nucleico de outra proteína (ou variante, fragmento, etc. da mesma), pode concretizar-se pelo uso de vectores intermediários. Em alternativa, um gene pode ser directamente clonado num vector que contenha o outro gene. Podem usar-se ligantes e adaptadores para juntar as sequências de ácido nucleico, bem como substituir sequências perdidas, onde no interior da

região relevante havia um local de restrição. O material genético (DNA) que codifica um polipéptido, péptido de ligação, e o outro polipéptido é inserido num vector de expressão adequado o qual é usado para transformar células procarióticas ou eucarióticas, por exemplo bactérias, leveduras, células de insectos ou células de mamíferos. O organismo transformado cresce e a proteína é isolada por técnicas correntes, por exemplo usando um marcador detectável tal como cromatografia de afinidade de quelato de níquel, se se usar uma cauda de polihistidina. O produto resultante é, pois, uma nova proteína, uma proteína de fusão, que tem PA modificada aglutinada a uma segunda proteína por uma região ligante. Para confirmar que a proteína de fusão está expressa, a proteína purificada é submetida a electroforese em géis de SDS-poliacrilamida, e transferida para filtros de membrana de nitrocelulose usando métodos definidos. Os produtos proteicos podem ser identificados por análise Western Blot recorrendo a anticorpos dirigidos contra os componentes individuais, ou seja, cauda de polihistidina e PA.

EXEMPLO 17

Composições farmacêuticas e modos de administração

Os portadores eficazes do ponto de vista farmacêutico úteis no caso presente são convencionais. Remington's Pharmaceutical Sciences, por Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edição (1975), descreve composições e formulações adequadas para administração farmacêutica.

Administração de péptidos

Numa configuração na qual uma toxina de PA modificada, como a das SEQ N° ID: 4, 24 e 25, é administrada a um sujeito, a proteína é aplicada por qualquer via conhecida dos especialistas. Entre os exemplos apontados contam-se:

intravenosa, intratumoral, oral, intraprostática, intramuscular, injeção subcutânea, transdérmica, etc. A presente divulgação apresenta igualmente composições farmacêuticas que incluem uma quantidade com eficácia terapêutica de uma toxina de PA modificada sozinha ou com um portador aceitável do ponto de vista farmacêutico. Adicionalmente, as composições farmacêuticas ou métodos de tratamento podem ser administrados em combinação (ou separadamente) com outro(s) tratamento(s) terapêutico(s). Exemplos de outras terapias incluem, entre outros, agentes antitumorais, células lisadas (como as produzidas por incubação com uma toxina de PA modificada), células não lisadas (como as que foram mortas por radiação), imunossuppressores (como o Rituximab, esteróides), e/ou citocinas (como GM-CSF). Podem ser preparadas configurações da divulgação, incluindo medicamentos, com portadores convencionais aceitáveis do ponto de vista farmacêutico, adjuvantes e contra-íões já conhecidos dos especialistas.

A toxina de PA modificada pode ser administrada em combinação com pelo menos um, podendo ser mais do que um, portador eficaz do ponto de vista farmacêutico, como um fluido aceitável do ponto de vista farmacêutico e fisiológico. Exemplos de portadores eficazes do ponto de vista farmacêutico incluem, entre outros, água, soro fisiológico, soluções salinas equilibradas, dextrose aquosa, óleo de sésamo, glicerol, etanol, combinações dos mesmos, ou semelhantes, como um veículo. O portador e a composição podem ser esterilizados, e a formulação deve adaptar-se ao modo de administração. Para além dos portadores biologicamente neutros, as composições farmacêuticas a administrar podem conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, conservantes, agentes tamponadores de pH e outros, por exemplo acetato de sódio ou monolaurato de sorbitano.

A composição pode ter a forma de solução líquida, suspensão, emulsão, comprimido, pastilha, cápsula, formulação de libertação controlada, ou pó. Para composições sólidas (por exemplo, pó, pastilha, comprimido, ou cápsula), os portadores convencionais sólidos não tóxicos podem incluir, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, sacarinato de sódio, celulose, carbonato de magnésio, ou estearato de magnésio. A composição pode ser formulada como um supositório, com portadores e ligantes tradicionais como triglicerídeos.

A quantidade de toxina de PA modificada, como a das SEQ N° ID: 4, 24 e 25, eficaz no tratamento de uma perturbação ou condição específica, como é o caso do cancro da próstata, depende da natureza da perturbação ou condição, e pode ser determinada por técnicas clínicas correntes. Adicionalmente, é possível recorrer a ensaios *in vitro* para identificar os intervalos de dosagem óptima (ver Exemplos 2, 4 e 5). A dosagem precisa a utilizar na formulação depende igualmente da gravidade da doença ou perturbação, e deve ser decidida em conformidade com o parecer do médico e as circunstâncias de cada caso. As doses eficazes podem ser extrapoladas a partir de curvas dose-resposta obtidas de sistemas de ensaios *in vitro* ou de modelo animal. Exemplos de doses iv eficazes de uma toxina de PA modificada para um humano de 70 kg são de cerca de 1-10 mg de toxina de PA modificada, por exemplo cerca de 1-5 mg, por exemplo cerca de 1-3 mg, por exemplo cerca de 2,8 mg. Exemplos de doses intraprostáticas ou intratumorais eficazes de uma toxina de PA modificada para um humano de 70 kg são de cerca de 10-100 mg de toxina de PA modificada, por exemplo cerca de 10-50 mg, por exemplo cerca de 10-30 mg, por exemplo cerca de 28 mg.

A divulgação apresenta também um conjunto ou kit farmacêutico que compreende um ou mais recipientes cheios com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas. Associado opcionalmente a este(s) recipiente(s) pode haver um aviso na

forma indicada pela entidade governamental que regule o fabrico, o uso ou a venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, no qual se deve reflectir a aprovação por essa entidade do fabrico, uso ou venda para administração em humanos. Podem também ser incluídas instruções para o uso da composição.

Administração de moléculas de ácidos nucleicos

Num exemplo em que se usa um ácido nucleico para permitir a expressão de um ácido nucleico numa célula, o ácido nucleico é administrado por via intracelular (por exemplo, por expressão de um vector de ácido nucleico ou por mecanismos mediados por receptor). Numa configuração, um ácido nucleico codifica uma PA modificada, como na SEQ N° ID: 4,24 ou 25.

São conhecidos vários sistemas para administrar um ácido nucleico, e incluem encapsulação em lipossoma, micropartículas, microcápsulas, endocitose mediada por receptor (Wu e Wu, *J. Biol. Chem.* 1987, 262:4429-32), e construção de ácidos nucleicos terapêuticos como parte de um retroviral ou outro vector. Os métodos de introdução incluem, entre outras vias, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, e oral. Os compostos podem ser administrados por qualquer via conveniente, por exemplo por infusão ou injeção em bólus, por absorção através dos revestimentos epitelial ou mucocutâneo (por exemplo, mucosa oral, rectal, vaginal, intestinal, etc.) e podem ser administrados em conjunto com outros agentes biologicamente activos. A administração pode ser sistémica ou local.

Os lipossomas fundem-se com o local alvo e libertam intracelularmente o conteúdo do lúmen. Os lipossomas são mantidos em contacto com as células alvo por um período de tempo suficiente para que a fusão ocorra, usando vários meios

para manter o contacto, tais como agentes de isolamento e de ligação. Os lipossomas podem ser preparados com proteínas ou péptidos purificados que mediam a fusão de membranas, tais como o vírus Sendai ou o vírus da gripe. Os lípidos podem ser qualquer combinação útil de lípidos conhecidos formadores de lipossomas, incluindo lípidos catiónicos, como a fosfatidilcolina. Outros lípidos potenciais incluem lípidos neutros, como colesterol, fosfatidil serina, fosfatidil glicerol, e outros. Para a preparação dos lipossomas, pode usar-se o procedimentos descrito por Kato *et al.* (*J. Biol. Chem.* 1991, 266:3361).

Se a molécula terapêutica for um ácido nucleico, a administração pode ser feita por um vector de expressão de ácido nucleico adequado que seja administrado de forma a tornar-se intracelular, por exemplo usando um vector retroviral (ver Patente dos EUA N°. 4.980.286), ou por injeção directa, ou recorrendo a um bombardeamento de micropartículas (por exemplo, uma "arma de genes"; Biolistic, Dupont), ou revestindo com lípidos ou receptores da superfície celular ou agentes de transfecção, ou administrando-a em ligação a um péptido do tipo *homeobox* que seja conhecido por entrar no núcleo (ver, por exemplo, Joliot *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88:1864-8), etc. Em alternativa, o ácido nucleico pode ser introduzido intracelularmente e incorporado no DNA da célula hospedeira para expressão por recombinação homóloga.

O pcDNA vector constitui um exemplo de um método de introdução do cDNA estranho numa célula sob o controlo de um forte promotor viral (CMV) para forçar a expressão. Contudo, podem ser usados outros vectores (ver Exemplo 15). Outros vectores retrovirais (tais como pRETRO-ON, Clontech), usam também este promotor mas têm as vantagens de entrar nas células sem qualquer auxiliar de transfecção, integrando-se no genoma das células alvo só quando a célula alvo se divide (como as

células cancerígenas fazem, sobretudo durante as primeiras remissões após a quimioterapia) e são reguladas. É também possível ligar a expressão de um ácido nucleico administrando tetraciclina quando se usam estes plasmídeos.

Outros vectores plasmídicos, como pMAM-neo (Clontech) ou pMSG (Pharmacia) usam o promotor MMTV-LTR (que pode ser regulado com esteróides) ou o promotor tardio SV10 (pSVL, Pharmacia) ou o promotor sensível à metalotioneína (pBPV, Pharmacia) e outros vectores virais, incluindo retrovírus. Exemplos de outros vectores virais incluem adenovírus, AAV (vírus adeno-associado), HSV recombinante, poxvírus (*vaccinia*) e lentivírus recombinante (como o HIV). Estes vectores concretizam o objectivo básico de colocarem na célula alvo a sequência de cDNA e os elementos de controlo necessários para a transcrição. A presente divulgação inclui todas as formas de administração de ácido nucleico, incluindo oligos sintéticos, DNA nu, plasmídica e viral, integrada no genoma ou não.

Tendo exemplificado e descrito novas toxinas de proaerolisina modificada, e métodos de utilização destas moléculas para tratar o cancro da próstata e suas metástases, um especialista pode constatar que a divulgação é susceptível de ser modificada em termos genéricos e no detalhe sem que tais princípios sejam abandonados. Tendo em vista as inúmeras configurações às quais os princípios da nossa divulgação se podem aplicar, há que reconhecer que as configurações exemplificadas constituem apenas exemplos particulares da divulgação e não devem ser considerados como uma limitação do âmbito da divulgação. Ou melhor, o âmbito da divulgação está de acordo com as reivindicações que se seguem. Por conseguinte, reivindicamos como nossa invenção tudo o que está abrangido no âmbito destas reivindicações

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> University of Victoria Innovation and Development Corporation e Johns Hopkins University.

<120> PROAEROLISINA CONTENDO SEQUÊNCIA DE ATIVAÇÃO DE PROTEASES E MÉTODOS DE USO PARA O TRATAMENTO DO CANCRO DA PRÓSTATA

<130> 2847-63499

<140>

<141>

<150> 60/314, 613

<151> 2001-08-24

<160> 25

<170> PatentIN versão 3.1

<2010> 1

<211> 1410

<212> DNA

<213> *Aeromonas hydrophilia*

<220>

<221> CD

<222> (1)..(1410)

<223>

100					105					110						
atc	aaa	cca	acc	agc	tat	ctg	gcc	cat	tac	ctc	ggt	tat	gcc	tgg	gtg	384
Ile	Lys	Pro	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ala	His	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ala	Trp	Val	
		115					120					125				
ggc	ggc	aat	cac	agc	caa	tat	gtc	ggc	gaa	gac	atg	gat	gtg	acc	cgt	432
Gly	Gly	Asn	His	Ser	Gln	Tyr	Val	Gly	Glu	Asp	Met	Asp	Val	Thr	Arg	
	130					135					140					
gat	ggc	gac	ggc	tgg	gtg	atc	cgt	ggc	aac	aat	gac	ggc	ggc	tgt	gac	480
Asp	Gly	Asp	Gly	Trp	Val	Ile	Arg	Gly	Asn	Asn	Asp	Gly	Gly	Cys	Asp	
145					150					155					160	
ggc	tat	cgc	tgt	ggt	gac	aag	acg	gcc	atc	aag	gtc	agc	aac	ttc	gcc	528
Gly	Tyr	Arg	Cys	Gly	Asp	Lys	Thr	Ala	Ile	Lys	Val	Ser	Asn	Phe	Ala	
			165						170					175		
tat	aac	ctg	gat	ccc	gac	agc	ttc	aag	cat	ggc	gat	gtc	acc	cag	tcc	576
Tyr	Asn	Leu	Asp	Pro	Asp	Ser	Phe	Lys	His	Gly	Asp	Val	Thr	Gln	Ser	
		180						185						190		
gac	cgc	cag	ctg	gtc	aag	act	gtg	gtg	ggc	tgg	gcg	gtc	aac	gac	agc	624
Asp	Arg	Gln	Leu	Val	Lys	Thr	Val	Val	Gly	Trp	Ala	Val	Asn	Asp	Ser	
		195					200					205				
gac	acc	ccc	caa	tcc	ggc	tat	gac	gtc	acc	ctg	cgc	tac	gac	aca	gcc	672
Asp	Thr	Pro	Gln	Ser	Gly	Tyr	Asp	Val	Thr	Leu	Arg	Tyr	Asp	Thr	Ala	
	210					215						220				
acc	aac	tgg	tcc	aag	acc	aac	acc	tat	ggc	ctg	agc	gag	aag	gtg	acc	720
Thr	Asn	Trp	Ser	Lys	Thr	Asn	Thr	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Thr	
225					230					235					240	
acc	aag	aac	aag	ttc	aag	tgg	cca	ctg	gtg	ggg	gaa	acc	caa	ctc	tcc	768
Thr	Lys	Asn	Lys	Phe	Lys	Trp	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Thr	Gln	Leu	Ser	
				245					250						255	
atc	gag	att	gct	gcc	aat	cag	tcc	tgg	gcg	tcc	cag	aac	ggg	ggc	tcg	816
Ile	Glu	Ile	Ala	Ala	Asn	Gln	Ser	Trp	Ala	Ser	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	
			260					265						270		
acc	acc	acc	tcc	ctg	tct	cag	tcc	gtg	cga	ccg	act	gtg	ccg	gcc	cgc	864
Thr	Thr	Thr	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Val	Arg	Pro	Thr	Val	Pro	Ala	Arg	
			275					280					285			
tcc	aag	atc	ccg	gtg	aag	ata	gag	ctc	tac	aag	gcc	gac	atc	tcc	tat	912
Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Lys	Ile	Glu	Leu	Tyr	Lys	Ala	Asp	Ile	Ser	Tyr	
	290					295					300					
ccc	tat	gag	ttc	aag	gcc	gat	gtc	agc	tat	gac	ctg	acc	ctg	agc	ggc	960
Pro	Tyr	Glu	Phe	Lys	Ala	Asp	Val	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	
305					310					315					320	
ttc	ctg	cgc	tgg	ggc	ggc	aac	gcc	tgg	tat	acc	cac	ccg	gac	aac	cgt	1008
Phe	Leu	Arg	Trp	Gly	Gly	Asn	Ala	Trp	Tyr	Thr	His	Pro	Asp	Asn	Arg	
				325					330						335	
ccg	aac	tgg	aac	cac	acc	ttc	gtc	ata	ggt	ccg	tac	aag	gac	aag	gcg	1056
Pro	Asn	Trp	Asn	His	Thr	Phe	Val	Ile	Gly	Pro	Tyr	Lys	Asp	Lys	Ala	

340	345	350	
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val			1104
355	360	365	
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr			1152
370	375	380	
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cgg gcg ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile			1200
385	390	395	400
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile			1248
405	410	415	
ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac agc aag gtg cgt cgt gct cgc Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg			1296
420	425	430	
agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp			1344
435	440	445	
gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val			1392
450	455	460	
acc cct gct gcc aat caa Thr Pro Ala Ala Asn Gln			1410
465	470		

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

<213> *Aeromonas hydrophilia*

<400> 2

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg
420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465 470

<210> 3

<211> 1410

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proaerolisina com uma sequência de PSA substituída pelo local de furina.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1410)

<400> 3

gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

48

ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa	96
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln	
20 25 30	
agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc	144
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser	
35 40 45	
ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa	192
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu	
50 55 60	
ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct	240
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro	
65 70 75 80	
gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt	288
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly	
85 90 95	
gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc	336
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe	
100 105 110	
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctg ggt tat gcc tgg gtg	384
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val	
115 120 125	
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt	432
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg	
130 135 140	
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac	480
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp	
145 150 155 160	
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc	528
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala	
165 170 175	
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc	576
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser	
180 185 190	
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc	624
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser	
195 200 205	
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc	672
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala	
210 215 220	
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc	720
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr	
225 230 235 240	
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctg tcc	768
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser	
245 250 255	

atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270	816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285	864
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290 295 300	912
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305 310 315 320	960
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg 325 330 335	1008
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala 340 345 350	1056
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355 360 365	1104
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370 375 380	1152
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cgg gcg ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385 390 395 400	1200
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405 410 415	1248
ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac agc cat tcc tcc aag ctg cag Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln 420 425 430	1296
agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp 435 440 445	1344
gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val 450 455 460	1392
acc cct gct gcc aat caa Thr Pro Ala Ala Asn Gln 465 470	1410

<210> 4
<211> 470

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proaerolisina com uma sequência de PSA substituída pelo local de furina.

<400> 4

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195 200 205

	100		105		110											
atc	aaa	cca	acc	agc	tat	ctg	gcc	cat	tac	ctc	ggg	tat	gcc	tgg	gtg	384
Ile	Lys	Pro	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ala	His	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ala	Trp	Val	
		115					120					125				
ggc	ggc	aat	cac	agc	caa	tat	gtc	ggc	gaa	gac	atg	gat	gtg	acc	cgt	432
Gly	Gly	Asn	His	Ser	Gln	Tyr	Val	Gly	Glu	Asp	Met	Asp	Val	Thr	Arg	
		130				135					140					
gat	ggc	gac	ggc	tgg	gtg	atc	cgt	ggc	aac	aat	gac	ggc	ggc	tgt	gac	480
Asp	Gly	Asp	Gly	Trp	Val	Ile	Arg	Gly	Asn	Asn	Asp	Gly	Gly	Cys	Asp	
145					150					155					160	
ggc	tat	cgc	tgt	ggg	gac	aag	acg	gcc	atc	aag	gtc	agc	aac	ttc	gcc	528
Gly	Tyr	Arg	Cys	Gly	Asp	Lys	Thr	Ala	Ile	Lys	Val	Ser	Asn	Phe	Ala	
				165					170					175		
tat	aac	ctg	gat	ccc	gac	agc	ttc	aag	cat	ggc	gat	gtc	acc	cag	tcc	576
Tyr	Asn	Leu	Asp	Pro	Asp	Ser	Phe	Lys	His	Gly	Asp	Val	Thr	Gln	Ser	
		180					185						190			
gac	cgc	cag	ctg	gtc	aag	act	gtg	gtg	ggc	tgg	gcg	gtc	aac	gac	agc	624
Asp	Arg	Gln	Leu	Val	Lys	Thr	Val	Val	Gly	Trp	Ala	Val	Asn	Asp	Ser	
		195					200					205				
gac	acc	ccc	caa	tcc	ggc	tat	gac	gtc	acc	ctg	cgc	tac	gac	aca	gcc	672
Asp	Thr	Pro	Gln	Ser	Gly	Tyr	Asp	Val	Thr	Leu	Arg	Tyr	Asp	Thr	Ala	
	210					215					220					
acc	aac	tgg	tcc	aag	acc	aac	acc	tat	ggc	ctg	agc	gag	aag	gtg	acc	720
Thr	Asn	Trp	Ser	Lys	Thr	Asn	Thr	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Thr	
225					230					235				240		
acc	aag	aac	aag	ttc	aag	tgg	cca	ctg	gtg	ggg	gaa	acc	caa	ctc	tcc	768
Thr	Lys	Asn	Lys	Phe	Lys	Trp	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Thr	Gln	Leu	Ser	
				245					250					255		
atc	gag	att	gct	gcc	aat	cag	tcc	tgg	gcg	tcc	cag	aac	ggg	ggc	tcg	816
Ile	Glu	Ile	Ala	Ala	Asn	Gln	Ser	Trp	Ala	Ser	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	
			260					265					270			
acc	acc	acc	tcc	ctg	tct	cag	tcc	gtg	cga	ccg	act	gtg	ccg	gcc	cgc	864
Thr	Thr	Thr	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Val	Arg	Pro	Thr	Val	Pro	Ala	Arg	
		275					280					285				
tcc	aag	atc	ccg	gtg	aag	ata	gag	ctc	tac	aag	gcc	gac	atc	tcc	tat	912
Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Lys	Ile	Glu	Leu	Tyr	Lys	Ala	Asp	Ile	Ser	Tyr	
	290					295					300					
ccc	tat	gag	ttc	aag	gcc	gat	gtc	agc	tat	gac	ctg	acc	ctg	agc	ggc	960
Pro	Tyr	Glu	Phe	Lys	Ala	Asp	Val	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	
305					310					315					320	
ttc	ctg	cgc	tgg	ggc	ggc	aac	gcc	tgg	tat	acc	cac	ccg	gac	aac	cgt	1008
Phe	Leu	Arg	Trp	Gly	Gly	Asn	Ala	Trp	Tyr	Thr	His	Pro	Asp	Asn	Arg	
				325					330					335		
ccg	aac	tgg	aac	cac	acc	ttc	gtc	ata	ggg	ccg	tac	aag	gac	aag	gcg	1056
Pro	Asn	Trp	Asn	His	Thr	Phe	Val	Ile	Gly	Pro	Tyr	Lys	Asp	Lys	Ala	

340			345			350										
agc	agc	att	cgg	tac	cag	tgg	gac	aag	cgt	tac	atc	ccg	ggt	gaa	gtg	1104
Ser	Ser	Ile	Arg	Tyr	Gln	Trp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Ile	Pro	Gly	Glu	Val	
		355					360					365				
aag	tgg	tgg	gac	tgg	aac	tgg	acc	ata	cag	cag	aac	ggt	ctg	tct	acc	1152
Lys	Trp	Trp	Asp	Trp	Asn	Trp	Thr	Ile	Gln	Gln	Asn	Gly	Leu	Ser	Thr	
	370					375					380					
atg	cag	aac	aac	ctg	gcc	aga	gtg	ctg	cgc	ccg	gtg	cgg	gcg	ggg	atc	1200
Met	Gln	Asn	Asn	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Arg	Pro	Val	Arg	Ala	Gly	Ile	
385					390					395				400		
acc	ggt	gat	ttc	agt	gcc	gag	agc	cag	ttt	gcc	ggc	aac	ata	gag	atc	1248
Thr	Gly	Asp	Phe	Ser	Ala	Glu	Ser	Gln	Phe	Ala	Gly	Asn	Ile	Glu	Ile	
			405					410					415			
ggt	gct	ccc	gtg	ccg	ctc	gcg	gct	gac	agc	cat	tcc	tcc	aag	ctg	cag	1296
Gly	Ala	Pro	Val	Pro	Leu	Ala	Ala	Asp	Ser	His	Ser	Ser	Lys	Leu	Gln	
		420						425					430			
agt	gcc	gac	ggc	gct	ggt	caa	ggc	ctg	agg	ctg	gag	atc	ccg	ctc	gat	1344
Ser	Ala	Asp	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Leu	Glu	Ile	Pro	Leu	Asp	
	435						440					445				
gcg	caa	gag	ctc	tcc	ggg	ctt	ggc	ttc	aac	aac	gtc	agc	ctc	agc	gtg	1392
Ala	Gln	Glu	Leu	Ser	Gly	Leu	Gly	Phe	Asn	Asn	Val	Ser	Leu	Ser	Val	
	450					455					460					
acc	cct	gct	gcc	aat	caa											1410
Thr	Pro	Ala	Ala	Asn	Gln											
465					470											

<210> 7

<211> 470

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proaerolisina com uma sequência de PSA substituída pelo local de furina

<400> 7

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln
420 425 430

Ser Ala Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465 470

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> local de clivagem de PSA

<400> 8

His Ser Ser Lys Leu Gln Ser Ala
1 5

<310> 9

<211> 1410

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proaerolisina com uma sequência de PSA substituída pelo local de furina

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1410)

<223>

<400> 9

gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa	48
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln	
1 5 10 15	
ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa	96
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln	
20 25 30	
agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc	144
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser	
35 40 45	
ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg cgg ggt tat aac ggt gaa	192
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu	
50 55 60	
ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct	240
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro	
65 70 75 80	
gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt	288
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly	
85 90 95	
gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc	336
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe	
100 105 110	
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg	384
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val	
115 120 125	
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt	432
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg	
130 135 140	
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac	480
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp	
145 150 155 160	
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc	528
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala	
165 170 175	
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc	576
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser	

	180	185	190	
	gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc			624
	Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser			
	195	200	205	
	gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc			672
	Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala			
	210	215	220	
	acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc			720
	Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr			
	225	230	235	240
	acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc			768
	Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser			
	245	250	255	
	atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg			816
	Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser			
	260	265	270	
	acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc			864
	Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg			
	275	280	285	
	tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat			912
	Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr			
	290	295	300	
	ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc			960
	Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly			
	305	310	315	320
	ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt			1008
	Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg			
	325	330	335	
	ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg			1056
	Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala			
	340	345	350	
	agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg			1104
	Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val			
	355	360	365	
	aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc			1152
	Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr			
	370	375	380	
	atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cgg gcg ggg atc			1200
	Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile			
	385	390	395	400
	acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc			1248
	Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile			
	405	410	415	
	ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac tcc cag ttc tat agc agc aat			1296
	Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Gln Phe Tyr Ser Ser Asn			

	420		425		430											
agt	gtg	gac	ggc	gct	ggg	caa	ggc	ctg	agg	ctg	gag	atc	cag	ctc	gat	1344
Ser	Val	Asp	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Leu	Glu	Ile	Pro	Leu	Asp	
		435					440					445				
gcg	caa	gag	ctc	tcc	ggg	ctt	ggc	ttc	aac	aac	gtc	agc	ctc	agc	gtg	1392
Ala	Gln	Glu	Leu	Ser	Gly	Leu	Gly	Phe	Asn	Asn	Val	Ser	Leu	Ser	Val	
		450				455					460					
acc	cct	gct	gcc	aat	caa											1410
Thr	Pro	Ala	Ala	Asn	Gln											
465					470											

<210> 10

<211> 470

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proaerolisina com uma sequência de PSA substituída pelo local de furina

<400> 10

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Gln Phe Tyr Ser Ser Asn
420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465 470

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> local de clivagem de PSA

<400> 11

Gln Phe Tyr Ser Ser Asn
1 5

<210> 12

<211> 1410

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proaerolisina com uma sequência de PSA substituída pelo local de furina

<220>

<221> CD

<222> (1)..(1410)

<223>

```
<400> 12
gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa      48
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1           5           10           15
ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa      96
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
```

20					25					30					
agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc	Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser	144													
35	40	45													
ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa	Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu	192													
50	55	60													
ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct	Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro	240													
65	70	75	80												
ggt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt	Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly	288													
	85	90	95												
gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc	Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe	336													
	100	105	110												
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg	Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val	384													
	115	120	125												
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt	Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg	432													
	130	135	140												
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac	Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp	480													
145	150	155	160												
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc	Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala	528													
	165	170	175												
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc	Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser	576													
	180	185	190												
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc	Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser	624													
	195	200	205												
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc	Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala	672													
	210	215	220												
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc	Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr	720													
225	230	235	240												
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggc gaa acc caa ctc tcc	Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser	768													
	245	250	255												
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggc ggc tcg	Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser	816													

260					265					270						
acc	acc	acc	tcc	ctg	tct	cag	tcc	gtg	cga	ccg	act	gtg	ccg	gcc	cgc	864
Thr	Thr	Thr	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Val	Arg	Pro	Thr	Val	Pro	Ala	Arg	
		275					280					285				
tcc	aag	atc	ccg	gtg	aag	ata	gag	ctc	tac	aag	gcc	gac	atc	tcc	tat	912
Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Lys	Ile	Glu	Leu	Tyr	Lys	Ala	Asp	Ile	Ser	Tyr	
	290					295					300					
ccc	tat	gag	ttc	aag	gcc	gat	gtc	agc	tat	gac	ctg	acc	ctg	agc	ggc	960
Pro	Tyr	Glu	Phe	Lys	Ala	Asp	Val	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	
305					310					315					320	
ttc	ctg	cgc	tgg	ggc	ggc	aac	gcc	tgg	tat	acc	cac	ccg	gac	aac	cgt	1008
Phe	Leu	Arg	Trp	Gly	Gly	Asn	Ala	Trp	Tyr	Thr	His	Pro	Asp	Asn	Arg	
				325					330					335		
ccg	aac	tgg	aac	cac	acc	ttc	gtc	ata	ggt	ccg	tac	aag	gac	aag	gcg	1056
Pro	Asn	Trp	Asn	His	Thr	Phe	Val	Ile	Gly	Pro	Tyr	Lys	Asp	Lys	Ala	
			340					345					350			
agc	agc	att	cgg	tac	cag	tgg	gac	aag	cgt	tac	atc	ccg	ggt	gaa	gtg	1104
Ser	Ser	Ile	Arg	Tyr	Gln	Trp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Ile	Pro	Gly	Glu	Val	
		355					360						365			
aag	tgg	tgg	gac	tgg	aac	tgg	acc	ata	cag	cag	aac	ggt	ctg	tct	acc	1152
Lys	Trp	Trp	Asp	Trp	Asn	Trp	Thr	Ile	Gln	Gln	Asn	Gly	Leu	Ser	Thr	
	370					375					380					
atg	cag	aac	aac	ctg	gcc	aga	gtg	ctg	cgc	ccg	gtg	cgg	gcg	ggg	atc	1200
Met	Gln	Asn	Asn	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Arg	Pro	Val	Arg	Ala	Gly	Ile	
385					390					395					400	
acc	ggt	gat	ttc	agt	gcc	gag	agc	cag	ttt	gcc	ggc	aac	ata	gag	atc	1248
Thr	Gly	Asp	Phe	Ser	Ala	Glu	Ser	Gln	Phe	Ala	Gly	Asn	Ile	Glu	Ile	
			405						410					415		
ggt	gct	ccc	gtg	ccg	ctc	gcg	gct	gac	ggt	ata	agt	agt	ttc	cag	agt	1296
Gly	Ala	Pro	Val	Pro	Leu	Ala	Ala	Asp	Gly	Ile	Ser	Ser	Phe	Gln	Ser	
			420					425					430			
agt	gtg	gac	ggc	gct	ggt	caa	ggc	ctg	agg	ctg	gag	atc	ccg	ctc	gat	1344
Ser	Val	Asp	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Leu	Glu	Ile	Pro	Leu	Asp	
		435					440					445				
gcg	caa	gag	ctc	tcc	ggg	ctt	ggc	ttc	aac	aac	gtc	agc	ctc	agc	gtg	1392
Ala	Gln	Glu	Leu	Ser	Gly	Leu	Gly	Phe	Asn	Asn	Val	Ser	Leu	Ser	Val	
	450					455					460					
acc	cct	gct	gcc	aat	caa											1410
Thr	Pro	Ala	Ala	Asn	Gln											
465					470											

<210> 13

<211> 470

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proaerolisina com uma sequência de PSA substituída pelo local de furina

<400> 13

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser
 420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465 470

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> local de clivagem de PSA

<400> 14

Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser
1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 15

Lys Gly Ile Ser Ser Gln Tyr
1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Ser Arg Lys Ser Gln Gln Tyr
1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Ala Thr Lys Ser Lys Gln His
1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Lys Gly Leu Ser Ser Gln Cys

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Leu Gly Gly Ser Ser Gln Leu
1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Glu His Ser Ser Lys Leu Gln
1 5

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Ser Lys Leu Gln
1

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<220>

<223> sequência de variante de LHRH

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Glu é um piroglutamato

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Lys é uma D-Lys

<400> 23

Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 34

<211> 397

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de péptido da proaerolisina

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> piroglutamato

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> D-Lys

<400> 24

Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser
1 5 10 15

Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu
20 25 30

Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
35 40 45

Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly
50 55 60

Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
65 70 75 80

Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala
85 90 95

Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys

	100		105		110														
His	Gly	Asp	Val	Thr	Gln	Ser	Asp	Arg	Gln	Leu	Val	Lys	Thr	Val	Val				
	115						120					125							
Gly	Trp	Ala	Val	Asn	Asp	Ser	Asp	Thr	Pro	Gln	Ser	Gly	Tyr	Asp	Val				
	130					135					140								
Thr	Leu	Arg	Tyr	Asp	Thr	Ala	Thr	Asn	Trp	Ser	Lys	Thr	Asn	Thr	Tyr				
145					150					155					160				
Gly	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Thr	Thr	Lys	Asn	Lys	Phe	Lys	Trp	Pro	Leu				
				165					170					175					
Val	Gly	Glu	Thr	Gln	Leu	Ser	Ile	Glu	Ile	Ala	Ala	Asn	Gln	Ser	Trp				
			180					185					190						
Ala	Ser	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Val				
		195					200						205						
Arg	Pro	Thr	Val	Pro	Ala	Arg	Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Lys	Ile	Glu	Leu				
	210					215					220								
Tyr	Lys	Ala	Asp	Ile	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Glu	Phe	Lys	Ala	Asp	Val	Ser				
225					230					235					240				
Tyr	Asp	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Phe	Leu	Arg	Trp	Gly	Gly	Asn	Ala	Trp				
				245					250					255					
Tyr	Thr	His	Pro	Asp	Asn	Arg	Pro	Asn	Trp	Asn	His	Thr	Phe	Val	Ile				
			260					265					270						
Gly	Pro	Tyr	Lys	Asp	Lys	Ala	Ser	Ser	Ile	Arg	Tyr	Gln	Trp	Asp	Lys				
		275					280					285							
Arg	Tyr	Ile	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Trp	Trp	Asp	Trp	Asn	Trp	Thr	Ile				
	290					295					300								
Gln	Gln	Asn	Gly	Leu	Ser	Thr	Met	Gln	Asn	Asn	Leu	Ala	Arg	Val	Leu				
305					310					315					320				
Arg	Pro	Val	Arg	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly	Asp	Phe	Ser	Ala	Glu	Ser	Gln				
				325					330					335					
Phe	Ala	Gly	Asn	Ile	Glu	Ile	Gly	Ala	Pro	Val	Pro	Leu	Ala	Ala	Asp				

<400> 25

Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser
1 5 10 15

Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu
20 25 30

Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
35 40 45

Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly
50 55 60

Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
65 70 75 80

Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala
85 90 95

Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys
 100 105 110

His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val
 115 120 125

Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val
 130 135 140

Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu
 165 170 175

Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp
 180 185 190

Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val
 195 200 205

Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu
 210 215 220

Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser
 225 230 235 240

Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp
 245 250 255

Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile
 260 265 270

Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys
 275 280 285

Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile
 290 295 300

Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu
 305 310 315 320

Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln
 325 330 335

Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp
340 345 350

Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu
355 360 365

Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe
370 375 380

Asn Asn Val Ser Leu Ser Val Thr Pro Ala Ala Asn Gln
385 390 395

Lisboa, 14 de Agosto de 2012.

REIVINDICAÇÕES

1. Um péptido purificado que compreende uma sequência de aminoácidos da variante da sequência de aminoácidos da proaerolisina, em que a variante da sequência de aminoácidos da proaerolisina compreende um local de clivagem de protease específico da próstata e um local de clivagem de furina funcionalmente suprimido, no qual o local de clivagem de protease específico da próstata substitui funcionalmente o local de clivagem de furina.
2. O péptido da reivindicação 1, no qual o local de clivagem de protease específico da próstata compreende um local de clivagem do antigénio específico da próstata (PSA), um local de clivagem do antigénio específico da membrana da próstata (PSMA), ou um local de clivagem da calicreína glandular humana 2 (hK2).
3. O péptido da reivindicação 2, no qual o local de clivagem de PSA compreende as SEQ N° ID: 5, 8, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou 21.
4. O péptido da reivindicação 3, no qual o local de clivagem de PSA compreende as SEQ N° ID: 5.
5. O péptido da reivindicação 1, no qual a sequência de aminoácidos da variante de proaerolisina compreende ainda um domínio de ligação funcionalmente suprimido.
6. O péptido da reivindicação 5, no qual o domínio de ligação é funcionalmente suprimido por deleção de aminoácidos 1-83 da SEQ N° ID: 2 ou 4.
7. O péptido da reivindicação 4, no qual o domínio de ligação é funcionalmente suprimido por inserção de pelo menos uma

mutação seleccionada do grupo composto por W45A, I47E, M57A.Y61A, e K66Q da SEQ N° ID: 2 ou 4.

8. O péptido da reivindicação 5, no qual o péptido compreende ainda um domínio de ligação específico do tecido prostático.
9. O péptido da reivindicação 8, no qual o domínio de ligação específico do tecido prostático compreende uma sequência da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH).
10. O péptido da reivindicação 9, no qual a sequência de LHRH compreende a SEQ N° ID: 22 ou 23.
11. O péptido da reivindicação 6, no qual o péptido compreende ainda uma sequência de LHRH ligada a um terminal N- da variante de proaerolisina.
12. O péptido da reivindicação 7, no qual a sequência de LHRH está ligada aos aminoácidos 215 ou 300 das SEQ N° ID: 2 ou 4, nas quais os aminoácidos 215 ou 300 sofreram uma mutação para uma cisteína.
13. O péptido da reivindicação 8, no qual o domínio de ligação específico do tecido prostático compreende um anticorpo que reconhece PSA. hK2, PSMA ou LHRH.
14. O péptido da reivindicação 13, no qual o anticorpo está ligado a um terminal N- da variante de proaerolisina.
15. O péptido da reivindicação 13, no qual o anticorpo está ligado a um terminal C- da variante de proaerolisina.
16. O péptido da reivindicação 9, no qual a sequência de péptidos compreende a SEQ N° ID: 24 ou 25.
17. O péptido da reivindicação 1, no qual o péptido está imobilizado numa superfície.

18. O péptido da reivindicação 17, no qual a superfície tem a forma de uma conta.
19. O péptido da reivindicação 18, no qual a conta compreende ainda um ligando específico da próstata.
20. Um péptido em conformidade com a reivindicação 1 para uso no tratamento do cancro da próstata de um sujeito.
21. para administração intratumoral e/ou intraprostática.
22. O péptido da reivindicação 20, para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea ou oral.
23. Uma sequência de ácidos nucleicos que encodes o péptido da reivindicação 1 para uso no tratamento do cancro da próstata de um sujeito.
24. O péptido da reivindicação 20, para tratar o cancro da próstata por contacto das células prostáticas cancerígenas do sujeito com o referido péptido.
25. O péptido da reivindicação 20, em que o sujeito tem um tumor prostático localizado.
26. Um péptido conforme com a reivindicação 1 para usar num método de tratamento sistémico de cancro da próstata num sujeito, em que o método compreende:
remoção de células prostáticas cancerígenas do sujeito;
contactar as células com o péptido da reivindicação 1, produzindo assim um lisado de células; e
administrar o lisado de células ao sujeito.
27. O péptido da reivindicação 26, em que o sujeito tem um tumor prostático metastático.
28. O péptido da reivindicação 26, em que o método compreende ainda a administração ao sujeito de GM-CSF.

29. O péptido da reivindicação 28, em que o método compreende ainda a administração ao sujeito de células prostáticas cancerígenas irradiadas.
30. O péptido da reivindicação 20, em que a administração resulta numa redução do volume das células prostáticas tumorais.
31. O péptido da reivindicação 30, em que o volume das células prostáticas tumorais sofre uma redução de pelo menos 10%.
32. O péptido da reivindicação 30, em que o volume das células prostáticas tumorais sofre uma redução de pelo menos 50%.
33. O péptido da reivindicação 26, em que a administração resulta numa redução do volume das células prostáticas tumorais.
34. O péptido da reivindicação 33, em que a administração resulta ainda numa redução do tumor prostático metastático.
35. O péptido da reivindicação 33, em que a administração resulta ainda no tratamento de um tumor prostático metastático.
36. Uma sequência de ácidos nucleicos purificados que codificam o péptido da reivindicação 1.

Lisboa, 14 de Agosto de 2012.

FIG 1

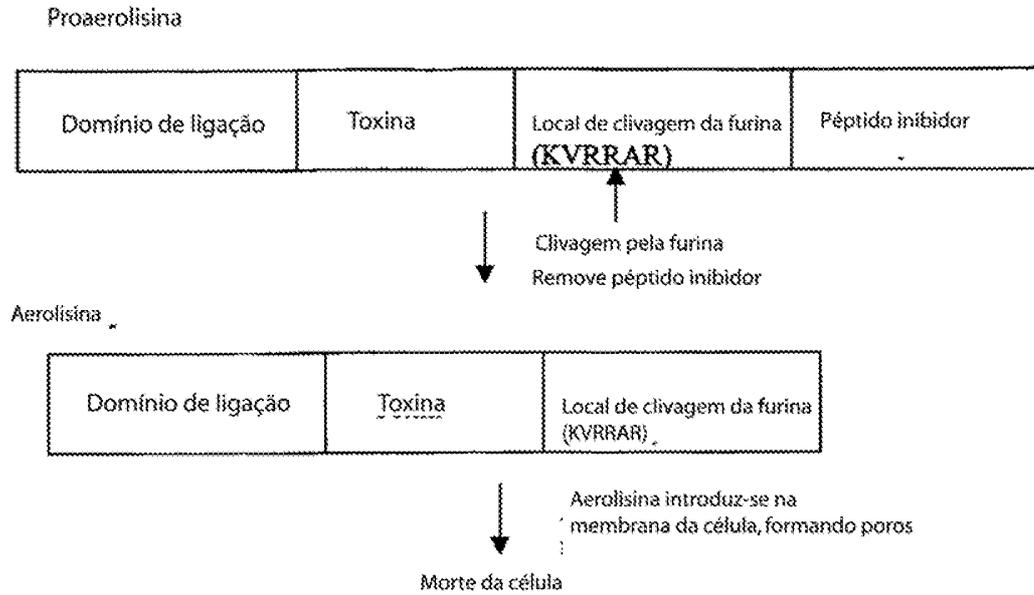


FIG 2

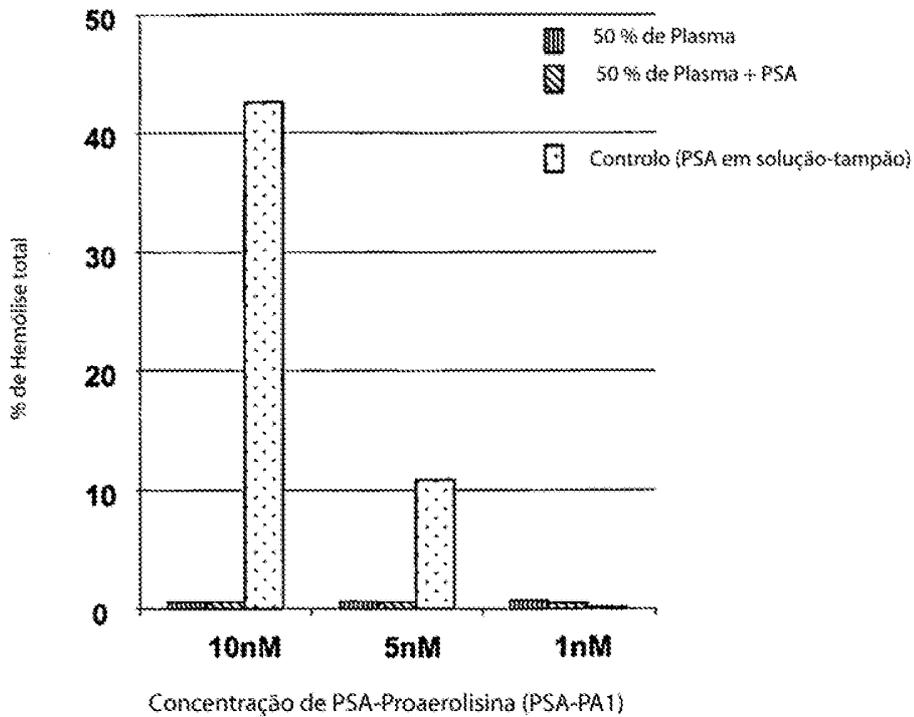


FIG 3

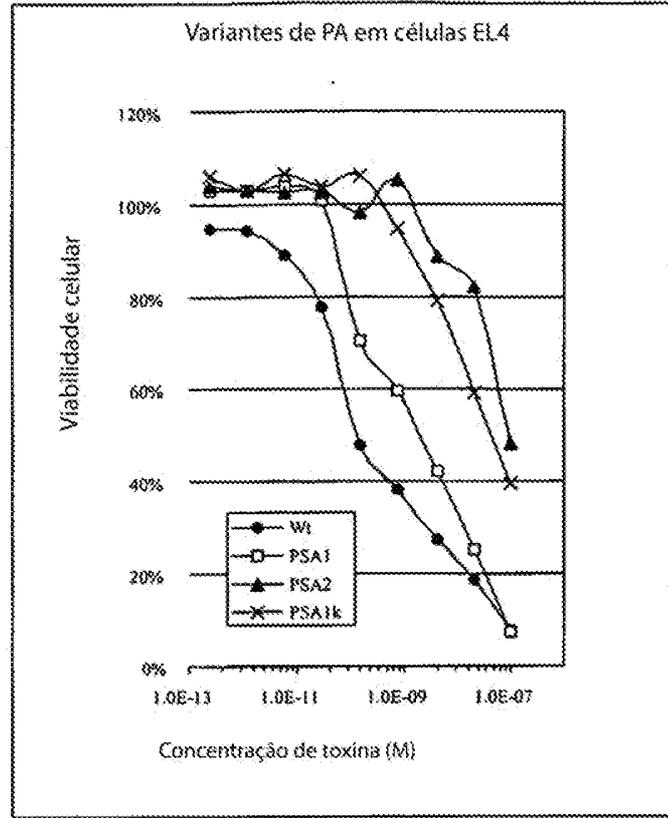


FIG 4

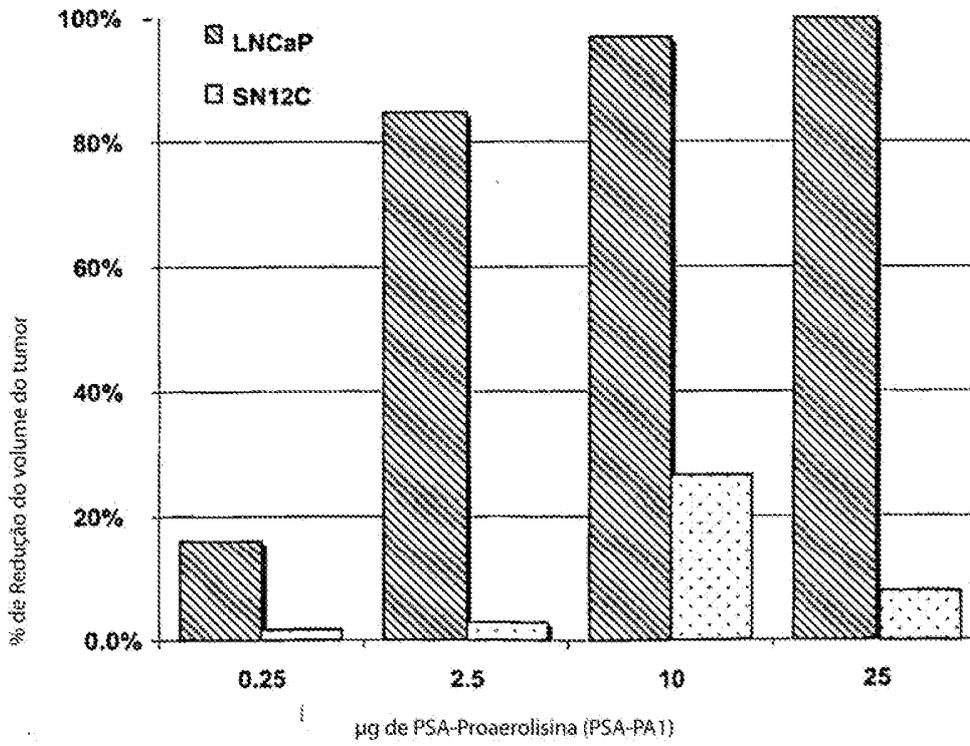


FIG 5A: Proaerolisina de tipo selvagem (SEQ Nº ID: 1 e 2)

Domínio de ligação	Toxina	Local de clivagem da furina (KVRRAR)	Péptido inibidor
--------------------	--------	-----------------------------------------	------------------

FIG 5B:

Domínio de ligação	Toxina	Local de clivagem da protease específica da próstata (por ex., HSSKIQ)	Péptido inibidor
--------------------	--------	------------------------------------------------------------------------------	------------------

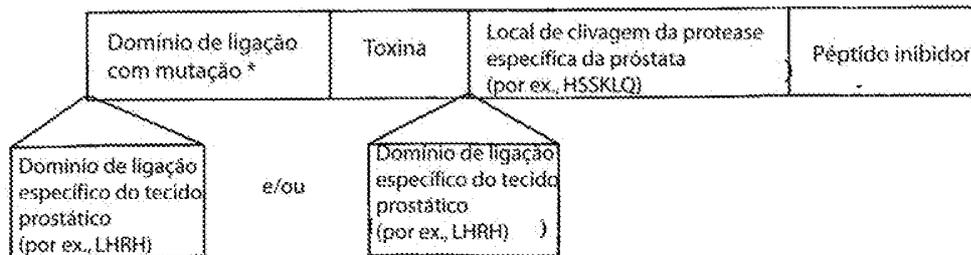
FIG 5C



FIG 5D Exemplo de uma variante de Proaerolisina com um domínio de ligação funcionalmente suprimido

Domínio de ligação com mutação *	Toxina	Local de clivagem da protease específica da próstata (por ex., HSSKIQ)	Péptido inibidor
-------------------------------------	--------	------------------------------------------------------------------------------	------------------

FIG 5E Exemplo de uma variante de Proaerolisina com um domínio de ligação funcionalmente substituído



Inserção num terminal N- de uma PA modificada

Inserção num terminal C- de uma PA modificada

FIG 5F Exemplo de uma variante de Proaerolisina com um domínio de ligação funcionalmente substituído

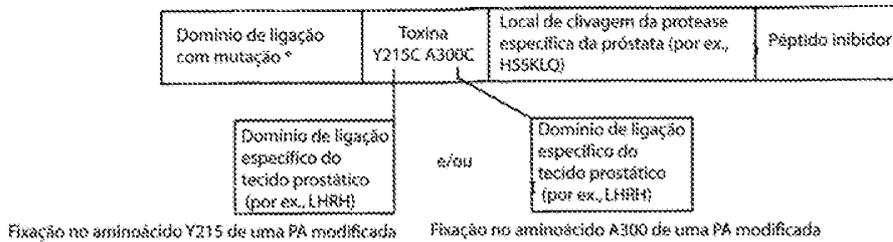


FIG 5G Exemplo de uma variante de Proaerolisina com um domínio de ligação funcionalmente suprimido (aminoácidos 1-83 suprimidos)

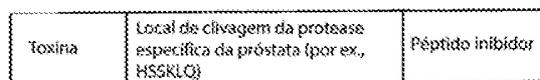


FIG 5H Exemplo de uma variante de Proaerolisina com um domínio de ligação funcionalmente substituído

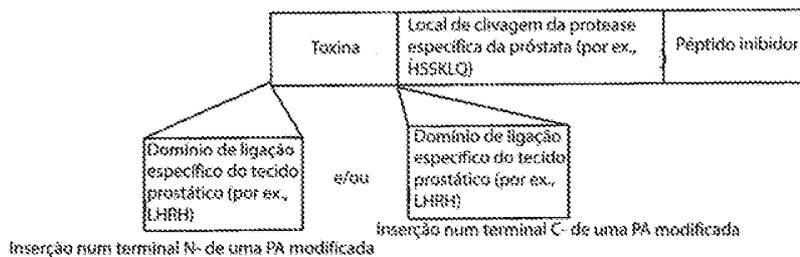


FIG 5I Exemplo de uma variante de Proaerolisina com um domínio de ligação funcionalmente substituído

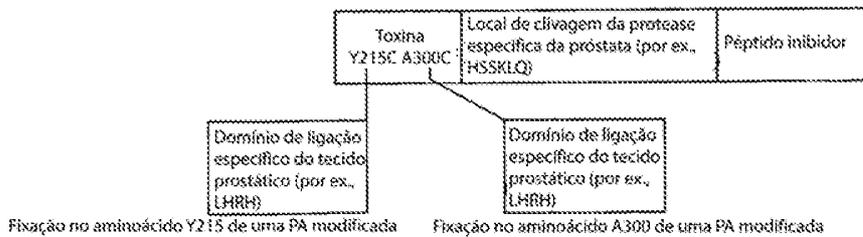


FIG 5J Exemplo de uma variante de Proaerolisina com um domínio de ligação funcionalmente substituído

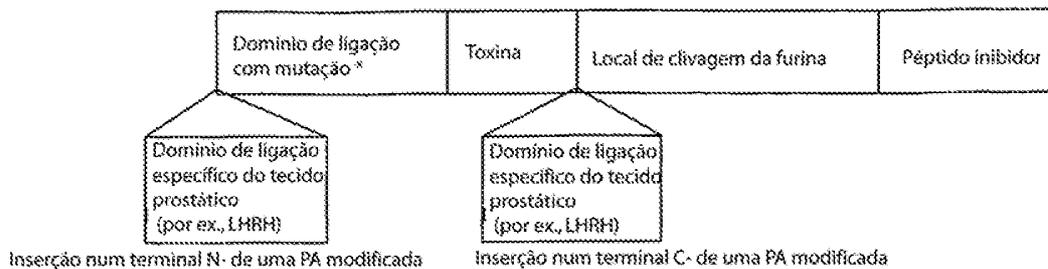


FIG 5K Exemplo de uma variante de Proaerolisina com um domínio de ligação funcionalmente substituído

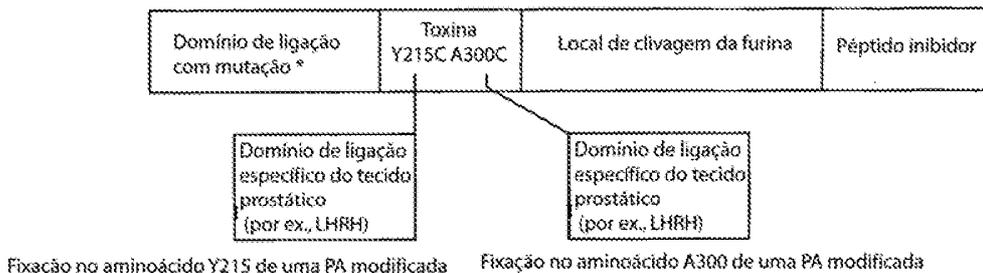


FIG 5L Exemplo de uma variante de Proaerolisina com um domínio de ligação funcionalmente substituído

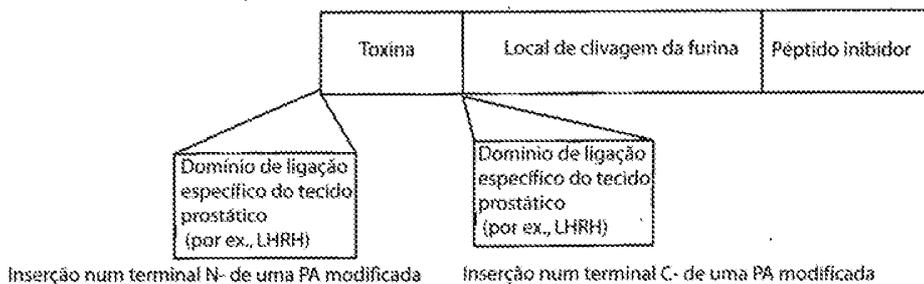


FIG 5M Exemplo de uma variante de Proaerolisina com um domínio de ligação funcionalmente substituído

