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

(11) BR 112019011799-7 B1

(22) Data do Depósito: 13/12/2017

(45) Data de Concessão: 21/12/2021

(54) Título: PROTEÍNA DE FUSÃO, PROTEÍNA DIMÉRICA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 38/00; A61K 38/20; C07K 14/54; C07K 14/55; C07K 19/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 13/12/2016 US 62/433,533.

(73) Titular(es): DELINIA, INC..

(72) Inventor(es): JEFFREY GREVE; JUNGMIN KIM; NIRANJANA NAGARAJAN; JOHN CHO.

(86) Pedido PCT: PCT US2017066163 de 13/12/2017

(87) Publicação PCT: WO 2018/112069 de 21/06/2018

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/06/2019

(57) Resumo: Esta invenção fornece compostos que contêm uma porção de ligação ao receptor de IL-2 e uma porção de ligação a ST2. Os métodos descritos na presente invenção fornecem um método para tratar uma condição administrando a um indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto contendo uma porção de ligação ao receptor de IL-2 e uma porção de ligação a ST2.

PROTEÍNA DE FUSÃO, PROTEÍNA DIMÉRICA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 62/433,533 depositado em 13 de dezembro de 2016, cujos conteúdos são incorporados na presente invenção em sua totalidade.

SUBMISSÃO DE LISTAGENS DE SEQUÊNCIA

[002] As Listagens de Sequência associadas a este pedido são depositadas em formato eletrônico através de EFS-Web e incorporadas na presente invenção por referência na especificação em sua totalidade. O nome do arquivo de texto contendo as Listagens de Sequência é 127754_00502_Sequence_Listing. O tamanho do arquivo de texto é de 91 KB, e o arquivo de texto foi criado em 13 de dezembro de 2017.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] As miopatias inflamatórias são condições que são caracterizadas por inflamação muscular crônica e fraqueza muscular. As distrofias musculares são doenças musculares degenerativas causadas por um gene da distrofina mutado, mas uma causa subjacente da degeneração progressiva é a inflamação muscular. A inflamação associada a essas doenças pode danificar as fibras do músculo, causando fadiga, dor e degeneração muscular progressiva. As células T reguladoras (Tregs) são um subconjunto especializado de células T. As Tregs suprimem a ativação do sistema imunológico e, deste modo, regulam a auto-tolerância do sistema imunológico. Os subconjuntos de Tregs que expressam marcadores moleculares definidos, tais como o receptor ST2, são encontrados em tecidos inflamados, tais como músculo esquelético lesionado e pulmões inflamados. Expansão e ativação de Tregs que expressam ST2 foram implicadas na resolução de lesão muscular aguda e de inflamação muscular associada à distrofia muscular. Adicionalmente, as Tregs $ST2^+$ são encontradas em tecidos tais

como adiposo visceral, cólon e pulmão, e possuem funções imunorreguladoras e de reparo de tecido nesses tecidos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma proteína de fusão compreendendo: um domínio proteico de IL-2 humana; um domínio proteico Fc de imunoglobulina; e um domínio proteico que se liga ao receptor tipo 1 da Interleucina 1 (ST2). Em certas modalidades, o domínio proteico que se liga ao ST2 é um domínio proteico de IL-33 humana. Em certas modalidades, o domínio proteico que se liga ao ST2 é um anticorpo específico para ST2, ou um fragmento de ligação ao antígeno deste. Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende pelo menos um domínio de peptídeo ligante. Em certas modalidades, o domínio proteico de IL-2 humana compreende IL-2 humana com uma substituição selecionada a partir do grupo que consiste em: T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L e Q126F, em relação à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o domínio proteico Fc de imunoglobulina compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na variante Fc de IgG1 humana de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 9. Em certas modalidades, o domínio proteico de IL-33 humana compreende IL-33 humana com uma substituição selecionada a partir do grupo que consiste em C208S, C227S, C232S e C259S, em relação à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em certas modalidades, o domínio de peptídeo ligante compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende ainda um primeiro domínio de peptídeo ligante e um segundo domínio de peptídeo ligante.

[005] Em certas modalidades das proteínas de fusão descritas na presente invenção, cada domínio tem uma amina terminal (N-terminal) e um carbóxi terminal (C-terminal); e em que a proteína de fusão é configurada de modo que

o C-terminal do domínio proteico de IL-2 humana seja fundido através de uma ligação peptídica ao N-terminal do primeiro domínio de peptídeo ligante; o N-terminal do domínio proteico Fc de IgG é fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do primeiro domínio de peptídeo ligante; o N-terminal do segundo domínio de peptídeo ligante é fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do domínio proteico Fc de IgG; e o N-terminal do domínio proteico que se liga ao ST2 é fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do segundo domínio de peptídeo ligante.

[006] Em certas modalidades das proteínas de fusão descritas na presente invenção, cada domínio tem uma amina terminal (N-terminal) e um carbóxi terminal (C-terminal); e em que a proteína de fusão é configurada de modo que o C-terminal do domínio proteico que se liga ao ST2 seja fundido através de uma ligação peptídica ao N-terminal do primeiro domínio de peptídeo ligante; o N-terminal do domínio proteico Fc de IgG é fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do primeiro domínio de peptídeo ligante; o N-terminal do segundo domínio de peptídeo ligante é fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do domínio proteico Fc de IgG; e o N-terminal do domínio proteico de IL-2 humana é fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do segundo domínio de peptídeo ligante. Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 25.

[007] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão aqui descrita. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma proteína dimérica compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma proteína dimérica compreendendo uma

primeira proteína de fusão e uma segunda proteína de fusão, em que: cada proteína de fusão compreende um domínio proteico Fc de imunoglobulina (IgG) e pelo menos um domínio proteico adicional selecionado a partir do grupo que consiste em um domínio proteico de IL-2 humana; e um domínio proteico que se liga ao receptor tipo 1 da Interleucina 1 (ST2); e a proteína dimérica compreende pelo menos um domínio proteico de IL-2 humana e pelo menos um domínio proteico que se liga ao ST2.

[008] Em certas modalidades, a primeira proteína de fusão compreende um domínio proteico de IL-2 humana, um primeiro domínio proteico Fc de imunoglobulina, e um primeiro peptídeo ligante; e a segunda proteína de fusão compreende um domínio proteico que se liga ao ST2, um segundo domínio proteico Fc de imunoglobulina e um segundo domínio de peptídeo ligante. Em certas modalidades, cada domínio tem uma amina terminal (N-terminal) e um carbóxi terminal (C-terminal); a primeira proteína de fusão é configurada de modo que o C-terminal do domínio proteico de IL-2 humana seja fundido através de uma ligação peptídica ao N-terminal do primeiro domínio de peptídeo ligante; e o N-terminal do primeiro domínio proteico Fc de IgG seja fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do primeiro domínio de peptídeo ligante; e a segunda proteína de fusão é configurada de modo que o C-terminal do segundo domínio proteico Fc de IgG seja fundido através de uma ligação peptídica ao N-terminal do segundo domínio de peptídeo ligante; e o N-terminal do domínio proteico que se liga ao ST2 seja fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do segundo domínio de peptídeo ligante. Em certas modalidades, o domínio proteico que se liga ao ST2 é um domínio proteico de IL-33 humana. Em certas modalidades, o domínio proteico que se liga ao ST2 é um anticorpo específico para ST2 ou um fragmento de ligação ao antígeno deste. Em certas modalidades, pelo menos uma das proteínas de fusão da proteína dimérica

compreende ainda pelo menos um domínio de peptídeo ligante. Em certas modalidades, o domínio proteico de IL-2 humana compreende IL-2 humana com uma substituição selecionada a partir do grupo que consiste em: T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L e Q126F, em relação à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o domínio proteico Fc de imunoglobulina compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na variante Fc de IgG1 humana de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 9. Em certas modalidades, o domínio proteico de IL-33 humana compreende IL-33 humana com uma substituição selecionada a partir do grupo que consiste em C208S, C227S, C232S e C259S, em relação à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em certas modalidades, o domínio de peptídeo ligante compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[009] Em certas modalidades das proteínas diméricas descritas na presente invenção, a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; a primeira proteína de fusão compreende o aminoácido de SEQ ID NO: 16 e a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 e a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; a primeira proteína de fusão e a segunda proteína de fusão compreendem, cada uma, a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; a primeira proteína de fusão e a segunda proteína de fusão compreendem,

cada uma, a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; a primeira proteína de fusão e a segunda proteína de fusão compreendem, cada uma, a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; a primeira proteína de fusão e a segunda proteína de fusão compreendem, cada uma, a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; a

primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; ou a primeira proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

[010] Em certas modalidades das proteínas diméricas descritas na presente invenção, a proteína de Fc de IgG compreende resíduos de cisteína, e a primeira proteína de fusão e a segunda proteína de fusão estão ligadas uma à outra através de resíduos de cisteína do domínio proteico Fc de IgG. Em certas modalidades, a proteína dimérica alveja seletivamente células T reguladoras $ST2^+$ em relação a células T reguladoras $ST2^-$. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita ou uma proteína dimérica aqui descrita.

[011] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um método para tratar uma condição, compreendendo o método administrar a um indivíduo em necessidade deste uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica da reivindicação 28. Em certas modalidades, a administração resulta em um maior aumento nos níveis de célula T reguladora $ST2^+$ no indivíduo em relação aos níveis de células T reguladoras $ST2^-$ no indivíduo. Em certas modalidades, a administração ativa seletivamente as células T reguladoras $ST2^+$ no indivíduo em relação a células T reguladoras $ST2^-$ no indivíduo. Em certas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz é de cerca de 1 µg/kg a cerca de 250 µg/kg.

[012] Em certas modalidades, a condição é uma miopatia inflamatória. Em certas modalidades, a miopatia inflamatória é selecionada a partir do grupo que

consiste em distrofia muscular, polimiosite e dermatomiosite. Em certas modalidades, a condição é selecionada a partir do grupo que consiste em uma condição inflamatória do tecido adiposo, uma condição inflamatória do cólon e uma condição inflamatória do pulmão. Em certas modalidades, o tecido adiposo é tecido adiposo visceral. Em certas modalidades, a condição é uma doença autoimune. Em certas modalidades, a doença autoimune é selecionada a partir do grupo que consiste em Doença do Enxerto contra Hospedeiro, Pênfigo Vulgar, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Esclerodermia, Colite Ulcerativa, Doença de Crohn, Psoríase, Diabetes Tipo 1, Esclerose Múltipla, Esclerose Lateral Amiotrófica, Alopecia Areata, Uveíte, Neuromielite Óptica e Distrofia Muscular de Duchenne. Em certas modalidades, a administração é intravenosa. Em certas modalidades, a administração é subcutânea. Em certas modalidades, o indivíduo é um ser humano.

[013] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um método de ativar seletivamente uma célula T reguladora $ST2^+$ em relação a uma célula T reguladora $ST2^-$ em um indivíduo, compreendendo o método administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica da reivindicação 28. Em certas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz é de cerca de 1 μg/kg a cerca de 250 μg/kg. Em certas modalidades, a administração é intravenosa. Em certas modalidades, a administração é subcutânea. Em certas modalidades, o indivíduo é um ser humano.

[014] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um composto compreendendo: a) uma primeira porção que se liga a um receptor de IL-2 covalentemente ligado a um domínio Fc de imunoglobulina; e b) uma segunda porção que se liga ao ST2 covalentemente ligado a um domínio Fc de imunoglobulina.

[015] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um composto

compreendendo: a) uma primeira porção que se liga a um receptor de IL-2; e b) uma segunda porção que se liga ao ST2; em que a primeira porção que se liga a um receptor de IL-2 compreende uma mutação em relação a IL-2 de tipo selvagem que aumenta a estabilidade em relação a IL-2 de tipo selvagem da porção que se liga ao receptor de IL-2 no indivíduo.

[016] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um composto compreendendo: a) uma primeira porção que se liga a um receptor de IL-2; e b) uma segunda porção que se liga ao ST2; em que a primeira porção que se liga a um receptor de IL-2 se liga seletivamente ao receptor de IL2Rαβγ em relação ao receptor de IL2Rβγ.

[017] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um composto compreendendo: a) uma primeira porção que se liga a um receptor de IL-2; e b) uma segunda porção que se liga ao ST2; em que a primeira porção que se liga a um receptor de IL-2 se difere de IL-2 de tipo selvagem em uma substituição que é N88R em relação ao IL-2 de tipo selvagem.

[018] Em algumas modalidades dos compostos descritos na presente invenção, a primeira porção compreende um polipeptídeo. Em algumas modalidades, a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 compreende uma sequência peptídica que tem pelo menos 90 % de identidade com IL-2 de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a mutação que aumenta a estabilidade em relação a IL-2 de tipo selvagem da porção que se liga ao receptor de IL-2 no indivíduo é uma substituição que é C125S em relação à IL-2 de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 se difere de IL-2 de tipo selvagem em uma substituição que é T3A em relação à IL-2 de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 tem pelo menos 90 % de identidade com a SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2

compreende a SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 é a SEQ ID NO: 1.

[019] Em algumas modalidades, a segunda porção que se liga ao ST2 compreende um polipeptídeo. Em algumas modalidades, a segunda porção que se liga ao ST2 compreende uma sequência peptídica que tem pelo menos 90 % de identidade com IL-33 de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a segunda porção que se liga ao ST2 tem pelo menos 90 % de identidade com a SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, a segunda porção que se liga ao ST2 é um anticorpo dirigido ao ST2, ou um fragmento de ligação ao antígeno deste. Em algumas modalidades, a segunda porção que se liga ao ST2 compreende a SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, a segunda porção que se liga ao ST2 é a SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e a segunda porção que se liga ao ST2 estão covalentemente ligadas. Em algumas modalidades, a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e a segunda porção que se liga ao ST2 estão covalentemente ligadas por uma ligação de dissulfeto.

[020] Em algumas modalidades dos compostos descritos na presente invenção, o composto compreende ainda duas porções de multimerização. Em algumas modalidades, uma primeira porção de multimerização está covalentemente ligada à primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e uma segunda porção de multimerização está covalentemente ligada à segunda porção que se liga ao ST2. Em algumas modalidades, as duas porções de multimerização estão covalentemente ligadas uma à outra. Em algumas modalidades, as duas porções de multimerização são sequências polipeptídicas. Em algumas modalidades, as duas porções de multimerização são domínios Fc de imunoglobulinas. Em algumas modalidades, os domínios Fc de imunoglobulinas são deficientes em funções efetoras em relação a domínios Fc de

imunoglobulinas de tipo selvagem correspondentes. Em algumas modalidades, os domínios Fc de imunoglobulinas são domínios Fc de imunoglobulinas IgG1. Em algumas modalidades, os domínios Fc de imunoglobulinas IgG1 se diferem de domínios Fc de imunoglobulinas IgG1 de tipo selvagem em uma substituição que é N297A em relação aos domínios Fc de imunoglobulinas IgG1 de tipo selvagem. Em algumas modalidades, cada domínio Fc de imunoglobulina compreende a SEQ ID NO: 7. Em algumas modalidades, cada domínio Fc de imunoglobulina é a SEQ ID NO: 7.

[021] Em algumas modalidades dos compostos descritos na presente invenção, o composto compreende um peptídeo ligante covalentemente ligado à primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e covalentemente ligado à primeira porção de multimerização. Em algumas modalidades, o composto compreende um peptídeo ligante covalentemente ligado à segunda porção que se liga ao ST2 e covalentemente ligado à segunda porção de multimerização. Em algumas modalidades, o composto compreende um primeiro peptídeo ligante covalentemente ligado à primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e está covalentemente ligado à primeira porção de multimerização, e um segundo peptídeo ligante covalentemente ligado à segunda porção que se liga ao ST2 e está covalentemente ligado à segunda porção de multimerização. Em algumas modalidades, a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 é o N-terminal ao primeiro peptídeo ligante, e a primeira porção de multimerização é o C-terminal ao primeiro peptídeo ligante, e a segunda porção que se liga ao ST2 é o N-terminal ao segundo peptídeo ligante, e a segunda porção de multimerização é o C-terminal ao segundo peptídeo ligante. Em algumas modalidades, o primeiro peptídeo ligante e o segundo peptídeo ligante são cada um de 6 a 20 resíduos de aminoácidos. Em algumas modalidades, o primeiro peptídeo ligante e o segundo peptídeo ligante são cada um de 12 a 17 resíduos de aminoácidos. Em algumas

modalidades, o primeiro peptídeo ligante e o segundo peptídeo ligante são, cada um, sequências de resíduos de aminoácidos que são, independentemente, serina ou glicina. Em algumas modalidades, o primeiro peptídeo ligante e o segundo peptídeo ligante são, cada um, de 15 resíduos de aminoácidos. Em algumas modalidades, o primeiro peptídeo ligante e o segundo peptídeo ligante são GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). Em algumas modalidades, o composto alveja seletivamente células T reguladoras $ST2^+$ em relação a células T reguladoras $ST2^-$.

[022] Em certos aspectos, a presente invenção refere-se a um método para tratar uma condição, compreendendo o método administrar a um indivíduo em necessidade deste uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 40. Em algumas modalidades, a administração aumenta uma contagem de células T reguladoras $ST2^+$ no indivíduo em relação a uma contagem de células T reguladoras $ST2^-$ no indivíduo. Em algumas modalidades, a administração ativa seletivamente as células T reguladoras $ST2^+$ no indivíduo em relação a células T reguladoras $ST2^-$ no indivíduo. Em algumas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz é de cerca de 1 μg/kg a cerca de 250 μg/kg. Em algumas modalidades, a condição é uma miopatia inflamatória. Em algumas modalidades, a miopatia inflamatória é distrofia muscular. Em algumas modalidades, a miopatia inflamatória é polimiosite. Em algumas modalidades, a miopatia inflamatória é dermatomiosite. Em algumas modalidades, a condição é uma condição inflamatória do tecido adiposo. Em algumas modalidades, o tecido adiposo é tecido adiposo visceral. Em algumas modalidades, a condição é uma condição inflamatória do cólon. Em algumas modalidades, a condição é uma condição inflamatória do pulmão. Em algumas modalidades, a administração é intravenosa. Em algumas modalidades, a administração é subcutânea. Em

algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[023] Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionados nesta especificação são incorporados na presente invenção por referência na mesma extensão como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado como estando incorporado por referência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[024] A FIG.1 mostra um diagrama que ilustra a sobreposição de células que expressam IL-2Rαβγ e ST2.

[025] A FIG. 2 mostra uma representação esquemática de um composto exemplar desta invenção.

[026] A FIG. 3A mostra um diagrama esquemático de um composto tendo uma porção de ligação ao IL2R, uma porção de ligação a ST2, e um ligante entre eles.

[027] A FIG. 3B mostra um diagrama esquemático de um composto exemplar tendo uma porção de ligação ao IL2R covalentemente ligada a uma porção de multimerização, uma porção de ligação a ST2 covalentemente ligada a uma porção de multimerização, e ligações covalentes entre as porções de multimerização.

[028] A FIG. 3C mostra um diagrama esquemático de um composto exemplar tendo uma porção de ligação ao IL2R covalentemente ligada a uma porção de multimerização, uma porção de ligação a ST2 covalentemente ligada a um ligante covalentemente ligado a uma porção de multimerização, e ligações covalentes entre as porções de multimerização.

[029] A FIG. 3D mostra um diagrama esquemático de um composto exemplar tendo uma porção de ligação ao IL2R covalentemente ligada a um

ligante covalentemente ligado a uma porção de multimerização, uma porção de ligação a ST2 covalentemente ligada a uma porção de multimerização, e ligações covalentes entre as porções de multimerização.

[030] A FIG. 3E mostra um diagrama esquemático de um composto exemplar tendo uma porção de ligação ao IL2R covalentemente ligada a um ligante covalentemente ligado a uma porção de multimerização, uma porção de ligação a ST2 covalentemente ligada a um ligante covalentemente ligado a uma porção de multimerização, e ligações covalentes entre as porções de multimerização.

[031] A FIG. 3F mostra um diagrama esquemático de um composto exemplar tendo a) uma porção de ligação ao IL2R covalentemente ligada a uma porção de multimerização covalentemente ligada a uma porção de ligação a ST2, b) uma porção de ligação a ST2 covalentemente ligada a uma porção de multimerização covalentemente ligada a uma porção de ligação ao IL2R, e c) ligações covalentes entre as porções de multimerização.

[032] As FIGS. 4A a 4J mostram diagramas esquemáticos de proteínas diméricas compreendendo regiões Fc de IgG1. As proteínas diméricas compreendem uma variante de IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S), ou várias combinações da variante de IL-33 e uma variante de IL-2 (N88R, C125S). Nos nomes de proteína, “N” indica N-terminal, “C” indica C-terminal, “v” indica variante, “B” indica bivalente e “M” indica monovalente.

[033] As FIGS. 5A a 5E mostram diagramas esquemáticos de proteínas diméricas compreendendo regiões Fc de IgG1. As proteínas diméricas compreendem uma variante de IL-2 (N88R, C125S) e um fragmento de ligação ao antígeno (Fab) que se liga ao ST2 (Ab2 ou Ab4). Cada diagrama representa duas proteínas diméricas diferentes, uma contendo Ab2 como a região de Fab e a outra contendo Ab4 como a região de Fab. Nos nomes de proteína, “N” indica N-

terminal, “C” indica C-terminal, “v” indica variante, “B” indica bivalente e “M” indica monovalente.

[034] A FIG. 6A mostra sensogramas Biacore que mostram a ligação entre ST2 humano e moléculas bispecificas de IL-2v/IL-33v e de IL-33 monovalentes.

[035] A FIG. 6B mostra sensogramas Biacore que mostram a ligação entre ST2 de camundongo e moléculas de IL-2v/IL-33v biespecíficas & IL-33 monovalentes.

[036] A FIG. 7 mostra sensogramas Biacore que mostram a ligação entre IL2R alfa humana e moléculas de IL-2v/IL-33v biespecíficas & IL-33 monovalentes.

[037] A FIG. 8A mostra sensogramas Biacore que mostram a ligação entre ST2 humano e moléculas Ab2/IL-2v biespecíficas.

[038] A FIG. 8B mostra sensogramas Biacore que mostram a ligação entre ST2 humano e moléculas Ab4/IL-2v biespecíficas.

[039] A FIG. 9A mostra sensogramas Biacore que mostram a ligação entre IL2R alfa humana e moléculas Ab2/IL-2v biespecíficas.

[040] A FIG. 9B mostra sensogramas Biacore que mostram a ligação entre IL2R alfa humana e moléculas Ab4/IL-2v biespecíficas.

[041] A FIG. 10A mostra a atividade de pSTAT5 em células T reguladoras $ST2^+$ em suspensões de células do baço de camundongo estimuladas com uma faixa de concentrações de N88R-Fc monovalente, IL-33-Fc monovalente ou IL2vNM-IL33vCM biespecíficas.

[042] A FIG. 10B mostra a atividade de pSTAT5 em células T reguladoras $ST2^-$ em suspensões de células do baço de camundongo estimuladas com uma faixa de concentrações de N88R-Fc monovalente, IL-33-Fc monovalente ou IL2vNM-IL33vCM biespecíficas.

[043] As FIG. 11A e 11B mostram a bioatividade da porção IL-33 em

proteínas IL33-IL2 biespecíficas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[044] As células T reguladoras (Tregs) são uma classe de células T $CD4^+CD25^+$ que suprimem a atividade de outras células imunes, tais como células T $CD4^+$ convencionais (Tconv) e células $CD8^+$. As Tregs são centrais para a homeostase do sistema imunológico, mantêm a tolerância aos auto-antígenos e modulam a resposta imune a antígenos estranhos. As Tregs podem ser robustamente ativadas pela Interleucina 2 (IL-2), mas a IL-2 também ativa muitos outros tipos de células, o que pode resultar em toxicidade significativa. Torna-se claro que existem subconjuntos de Tregs que podem ser definidos pela expressão de marcadores moleculares específicos e pelo seu papel em diferentes respostas imunológicas. Um subconjunto de Treg é o subconjunto de Treg $ST2^+$. O marcador de superfície celular definido para Tregs $ST2^+$ é ST2, um componente de um receptor de citocina também conhecido como proteína receptora tipo 1 da Interleucina 1 (IL1RL1), e que é uma subunidade do receptor de IL-33. A IL-33 é categorizada como uma “alarmina”, uma citocina inflamatória associada a respostas inflamatórias agudas. As Tregs $ST2^+$ são encontradas em tecidos tais como músculo, adiposo visceral, cólon e pulmão, e possui funções imunorreguladoras e de reparo de tecido.

[045] O músculo esquelético é normalmente desprovido de células T, mas após lesão muscular aguda, um grande número de Tregs $ST2^+$ migra rapidamente para o tecido muscular em grandes números. O recrutamento destas Tregs no tecido muscular e a produção do fator de crescimento anfirregulina (AREG) foi associado com a ativação de células satélites musculares e com reparação tecidual. A deficiência de Treg prejudica a reparação muscular depois da lesão, e a expansão de Tregs no músculo utilizando complexos IL-2-IL-2R leva a melhores resultados em um modelo animal de distrofia muscular deficiente em distrofina.

Uma fração significativa de Tregs que produzem AREG são $ST2^+$. As Tregs $ST2^+$ também têm sido associadas com tecido pulmonar inflamado após infecção por vírus influenza, e estão associadas com a reparação do tecido pulmonar após a infecção. O tratamento de Treg $ST2^+$ com o ligante para o receptor ST2, IL-33, aumenta a produção de AREG e a reparação tecidual. Portanto, o aumento do número de Tregs $ST2^+$ ou da atividade de Tregs $ST2^+$ pode tratar ou prevenir doenças autoimunes e inflamatórias tais como miopatias inflamatórias, doenças musculares inflamatórias e melhorar a cicatrização do tecido depois da lesão ou estresse.

[046] Por exemplo, o papel das Tregs $ST2^+$ foi estabelecido em modelos animais de inflamação muscular. Um destes modelos animais é lesão muscular aguda (Burzyn *et al.*, 2013, Cell 155(6): 1282 - 1295) em camundongos de tipo selvagem, e um segundo modelo é o modelo de distrofia muscular em camundongos *mdx*, um modelo de inflamação muscular crônica causada por deficiência genética em distrofina (*mdx* mice; Villalta *et al.*, 2014, Sci Transl Med 5(258): 258ra142). Um papel para Treg $ST2^+$ também tem sido estabelecido em um modelo de camundongo de doença inflamatória intestinal (Schiering *et al.*, 2014, Nature 513(7519): 564 - 568).

[047] Ao fornecer compostos e métodos que são capazes de expandir seletivamente os números de Tregs $ST2^+$ e/ou realçar a atividade de Treg $ST2^+$, a presente invenção torna possível novos tratamentos de doenças inflamatórias e degenerativas. Por exemplo, a presente invenção fornece um composto com uma primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 (IL-2R ou IL2R) e uma segunda porção que se liga ao ST2. IL-2R é uma proteína heterotrimérica expressada em uma variedade de diferentes tipos de células imunológicas, incluindo células T, células NK, eosinófilos e monócitos. Este padrão de expressão ampla fornece um efeito pleiotrópico no sistema imunológico e uma alta

toxicidade sistêmica de tratamentos com IL-2, e pode tornar desafiador o alvejamento de células IL-2R$^+$.

[048] A IL2-R tem três formas, geradas por diferentes combinações de três diferentes proteínas IL-2R: α (alfa), β (beta) e γ (gama). Essas cadeias receptoras se juntam para gerar as três diferentes formas de receptores: (1) o receptor de baixa afinidade, IL2Rα, que não sinaliza; (2) o receptor de afinidade intermediária (IL2Rβγ), composto por IL2Rβ e IL2Rγ, que é amplamente expressado em células T CD4$^+$ convencionais (Tconv), células NK, eosinófilos e monócitos; e (3) o receptor de alta afinidade (IL2Rαβγ), composto por IL2Rα, IL2Rβ e IL2Rγ, que é expressado transitoriamente em células T ativadas e constitutivamente em células Treg. As células T convencionais (Tconv) são aquelas que são ativadas por antígenos e participam do ataque imune. As células T convencionais incluem células T auxiliares, células T citotóxicas e células T de memória. As mutações em IL-2 podem alterar a afinidade de ligação de IL-2 a diferentes formas de receptores de IL-2R. Assim, a presente invenção fornece compostos que ativam e expandem seletivamente Tregs, por exemplo, Tregs ST2$^+$, compreendendo uma porção que se liga seletivamente ao receptor de alta afinidade (IL2Rαβγ). Uma porção exemplar inclui, mas não está limitada a uma variante de IL-2 compreendendo uma ou mais mutações que modificam a ligação em relação a IL-2 de tipo selvagem de modo que a variante de IL-2 se liga seletivamente ao receptor de alta afinidade (IL2Rαβγ) em relação ao receptor de afinidade intermediária e ao receptor de baixa afinidade.

[049] Os métodos e composições da presente invenção referem-se a um composto compreendendo uma primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e uma segunda porção que se liga ao ST2, permitindo que o composto seja muito mais seletivo e potente em sua capacidade para ativar e expandir Tregs ST2$^+$. Em algumas modalidades, estes compostos alvejam células que expressam o

receptor de IL-2 ou uma isoforma específica deste, e ST2. Por exemplo, um composto que se liga especificamente à isoforma IL2Rαβγ pode se ligar a células Treg que expressam ST2. A FIG. 1 mostra os domínios de expressão de IL-2Rαβγ e ST2 em uma população mista de Tregs e um exemplo de uma área de sobreposição onde um composto desta invenção pode se ligar. Em algumas modalidades, a primeira e a segunda porções estão covalentemente ligadas, por exemplo, por um domínio Fc de imunoglobulina. Em algumas modalidades, o composto também compreende um ligante juntando a porção de ligação ao receptor de IL-2 e o domínio Fc de imunoglobulina e/ou um ligante juntando a porção de ligação a ST2 e o domínio Fc de imunoglobulina. Em algumas modalidades, o composto pode regular as atividades de glóbulos brancos, por exemplo, leucócitos ou linfócitos, que são responsáveis pela imunidade. O domínio Fc de imunoglobulina pode aumentar a estabilidade *in vivo* da molécula, e o ligante liga covalentemente uma porção e um domínio Fc. Fornecendo-se porções que se ligam ao receptor de IL2 e ao ST2, os compostos aqui descritos podem alvejar células (por exemplo, células T reguladoras) que expressam o receptor de IL2 e ST2. Em algumas modalidades, um domínio Fc é deficiente em suas funções efetoras. Um composto exemplar compreende uma primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e uma segunda porção que se liga ao ST2, em que a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 está covalentemente ligada a um primeiro domínio Fc deficiente em efetor por meio de um ligante e a segunda porção que se liga ao ST2 está covalentemente ligada a um segundo domínio Fc deficiente em efetor por meio de um ligante, e em que o primeiro domínio Fc deficiente em efetor e o segundo domínio Fc deficiente em efetor estão covalentemente ligados através de uma ligação de dissulfeto. Um exemplo de tal composto é mostrado na FIG. 2. Outros compostos exemplares são mostrados nas FIGS. 3A a 3E, que representam compostos compreendendo

porções de ligação a ST2 e de ligação ao IL2R, em várias combinações com ligantees e domínios de multimerização (que podem ser, por exemplo, domínios Fc). Outro exemplo de tal composto é mostrado na FIG. 3F, em que uma porção de IL2 e uma porção de ligação a ST2 estão no N-terminal e no C-terminal, respectivamente, de uma proteína IgG Fc. Tal proteína pode estar em orientação invertida, em que a porção de ligação a ST2 está no N-terminal e a porção de IL2 está no C-terminal, e pode incorporar ligantees peptídicos entre uma ou ambas as porções de ligação de ST-2 e seus respectivos domínios Fc, ou entre uma ou ambas as porções de ligação de IL2R e seus respectivos domínios Fc. Um método exemplar para tratar uma condição, por exemplo, uma condição inflamatória tal como uma miopatia inflamatória, compreende administrar a um indivíduo em necessidade deste uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto como aqui descrito. Condições exemplares incluem, mas não estão limitadas a distrofia muscular e dermatomiosite.

Porções que se ligam ao receptor de IL-2

[050] Como descrito acima, a presente invenção fornece um composto compreendendo uma primeira porção que se liga a um receptor de IL-2 e uma segunda porção que se liga a ST2. Uma porção que se liga a um receptor de IL-2 pode ser um polipeptídeo compreendendo o comprimento total de IL-2 de tipo selvagem, mais curto ou mais longo. A porção de ligação ao receptor de IL-2 pode ter uma sequência de IL-2 de tipo selvagem, como mostrado em SEQ ID NO: 2: (APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFX QSIISTLT) ou uma variante de IL-2. As variantes de IL-2 podem conter uma ou mais substituições, deleções ou inserções que se desviam da sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem. Os resíduos são aqui designados pelo código de aminoácido de uma letra seguido pela posição de aminoácido de IL-2,

por exemplo, K35 é o resíduo de lisina na posição 35 da sequência de IL-2 de tipo selvagem. As substituições são aqui designadas pelo código de aminoácido de uma letra seguido pela posição de aminoácido de IL-2 seguida pela substituição do código de aminoácido de uma letra, por exemplo, K35A é uma substituição do resíduo de lisina na posição 35 de SEQ ID NO: 2 com um resíduo de alanina.

[051] Os compostos da presente invenção podem exibir especificidade para diferentes classes de receptores de IL-2 que são similares ou diferentes da especificidade de IL-2 de tipo selvagem. Os compostos da presente invenção podem exibir estabilidade ou efeito biológico melhorados em comparação com IL-2 de tipo selvagem. Por exemplo, uma mutação pode fornecer um composto com especificidade melhorada para certos receptores de IL-2 em comparação com IL-2 de tipo selvagem. Em algumas modalidades, um composto se liga seletivamente ao receptor de IL2Rαβγ em relação ao receptor de IL2Rβγ, por exemplo, através de sua porção de ligação de IL-2. Em algumas modalidades, esta ligação seletiva é devido a uma ou mais mutações em uma sequência de IL-2 em comparação com uma sequência de IL-2 de tipo selvagem. Por exemplo, IL-2 N88R é seletivo para ligação ao receptor de IL2Rαβγ sobre o receptor de IL2Rβγ. IL-2 pode estimular a proliferação de células T ativadas por PHA que expressam IL2Rαβγ tão eficazmente quanto IL-2 de tipo selvagem, enquanto exibe uma estimulação reduzida de 3.000 vezes da proliferação de células NK que expressam IL2Rβγ. Outras mutações que exibem seletividade aumentada para IL2Rαβγ incluem as substituições D20H, N88I, N88G, Q126L e Q126F.

[052] Em algumas modalidades, uma porção de ligação ao receptor de IL-2 compreende uma mutação que aumenta a estabilidade de um composto da presente invenção. Por exemplo, uma mutação IL-2 C125S promove a estabilidade eliminando-se um resíduo de cisteína não pareado, evitando assim a configuração anormal do polipeptídeo IL-2. A configuração anormal pode levar

à agregação de proteína e aumentar a depuração do polipeptídeo *in vivo*. Em algumas modalidades, um polipeptídeo IL-2 compreende uma mutação que cria ou remove um sítio de glicosilação. Por exemplo, a mutação de IL-2 T3A remove um sítio de glicosilação ligado a O. Em algumas modalidades, uma variante de IL-2 com a mutação T3A também compreende uma mutação N88R e/ou uma mutação C125S. Em algumas modalidades, uma variante de IL-2 compreende as mutações T3A, N88R e C125S, como em SEQ ID NO: 3.

[053] Em algumas modalidades, as substituições ocorrem em uma ou mais das posições 3, 20, 88, 125 e 126. Em algumas modalidades, as substituições ocorrem em uma, duas, três, quatro ou cinco das posições. Em algumas modalidades, uma variante de IL-2 compreende mutações nas posições 88 e 125, por exemplo, N88R e C125S. Em algumas modalidades, uma porção de ligação ao receptor de IL-2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 1: APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT. Em algumas modalidades, uma variante de IL-2 compreende mutações nas posições 3, 88 e 125, por exemplo, T3A, N88R e C125S, como em SEQ ID NO: 3:

APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT. Em algumas modalidades, uma variante de IL-2 compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 mutações (por exemplo, substituições) em comparação com uma sequência de IL-2 de tipo selvagem.

[054] Os compostos da presente invenção incluem variantes de IL-2 compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60 %, pelo menos 61 %, pelo menos 62 %, pelo menos 63 %, pelo menos 64 %, pelo menos

65 %, pelo menos 66 %, pelo menos 67 %, pelo menos 68 %, pelo menos 69 %, pelo menos 70 %, pelo menos 71 %, pelo menos 72 %, pelo menos 73 %, pelo menos 74 %, pelo menos 75 %, pelo menos 76 %, pelo menos 77 %, pelo menos 78 %, pelo menos 79 %, pelo menos 80 %, pelo menos 81 %, pelo menos 82 %, pelo menos 83 %, pelo menos 84 %, pelo menos 85 %, pelo menos 86 %, pelo menos 87 %, pelo menos 88 %, pelo menos 89 %, pelo menos 90 %, pelo menos 91 %, pelo menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2). Os compostos da presente invenção incluem variantes de IL-2 compreendendo uma sequência de aminoácidos que é 60 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem, por exemplo, uma sequência de aminoácidos que é 80 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem, uma sequência de aminoácidos que é 85 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem, uma sequência de aminoácidos que é 90 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem ou uma sequência de aminoácidos que é 95 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2). Os compostos aqui incluem variantes de IL-2 que compreendem uma sequência de aminoácidos tendo uma mutação N88R que é pelo menos 60 %, pelo menos 61 %, pelo menos 62 %, pelo menos 63 %, pelo menos 64 %, pelo menos 65 %, pelo menos 66 %, pelo menos 67 %, pelo menos 68 %, pelo menos 69 %, pelo menos 70 %, pelo menos 71 %, pelo menos 72 %, pelo menos 73 %, pelo menos 74 %, pelo menos 75 %, pelo menos 76 %, pelo menos 77 %, pelo menos 78 %, pelo menos 79 %, pelo menos 80 %, pelo menos 81 %, pelo menos 82 %, pelo menos 83 %, pelo menos 84 %, pelo menos 85 %, pelo menos 86 %, pelo menos 87 %, pelo menos 88 %, pelo menos 89 %, pelo menos 90 %, pelo menos 91 %, pelo

menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2). Os compostos aqui incluem variantes de IL-2 compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo uma mutação N88R que é 60 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem, por exemplo, uma sequência de aminoácidos que é 80 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), uma sequência de aminoácidos que é 85 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), uma sequência de aminoácidos que é 90 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), ou uma sequência de aminoácidos que é 95 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2).

[055] As modalidades também incluem variantes de IL-2 que estimulam seletivamente células Treg e compreendem uma sequência de aminoácidos tendo mutações N88R e C125S que é pelo menos 60 %, pelo menos 61 %, pelo menos 62 %, pelo menos 63 %, pelo menos 64 %, pelo menos 65 %, pelo menos 66 %, pelo menos 67 %, pelo menos 68 %, pelo menos 69 %, pelo menos 70 %, pelo menos 71 %, pelo menos 72 %, pelo menos 73 %, pelo menos 74 %, pelo menos 75 %, pelo menos 76 %, pelo menos 77 %, pelo menos 78 %, pelo menos 79 %, pelo menos 80 %, pelo menos 81 %, pelo menos 82 %, pelo menos 83 %, pelo menos 84 %, pelo menos 85 %, pelo menos 86 %, pelo menos 87 %, pelo menos 88 %, pelo menos 89 %, pelo menos 90 %, pelo menos 91 %, pelo menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2). Os compostos da presente invenção incluem variantes de IL-2 compreendendo uma sequência de

aminoácidos tendo mutações N88R e C125S que é 60 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), por exemplo, uma sequência de aminoácidos que é 80 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), uma sequência de aminoácidos que é 85 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), uma sequência de aminoácidos que é 90 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), ou uma sequência de aminoácidos que é 95 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2).

[056] Os compostos também incluem variantes de IL-2 que estimulam seletivamente células Treg e compreendem uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60 %, pelo menos 61 %, pelo menos 62 %, pelo menos 63 %, pelo menos 64 %, pelo menos 65 %, pelo menos 66 %, pelo menos 67 %, pelo menos 68 %, pelo menos 69 %, pelo menos 70 %, pelo menos 71 %, pelo menos 72 %, pelo menos 73 %, pelo menos 74 %, pelo menos 75 %, pelo menos 76 %, pelo menos 77 %, pelo menos 78 %, pelo menos 79 %, pelo menos 80 %, pelo menos 81 %, pelo menos 82 %, pelo menos 83 %, pelo menos 84 %, pelo menos 85 %, pelo menos 86 %, pelo menos 87 %, pelo menos 88 %, pelo menos 89 %, pelo menos 90 %, pelo menos 91 %, pelo menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2). Os compostos também incluem variantes de IL-2 que estimulam seletivamente células Treg e compreendem uma sequência de aminoácidos que é 60 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), por exemplo, uma sequência de aminoácidos que é 80 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), uma sequência de

aminoácidos que é 85 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), uma sequência de aminoácidos que é 90 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), ou uma sequência de aminoácidos que é 95 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-2 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2).

[057] Vários métodos e programas de software podem ser utilizados para determinar a homologia entre dois ou mais peptídeos ou ácidos nucleicos, tais como NCBI BLAST, Clustal W, MAFFT, Clustal Omega, AlignMe, Praline ou outro método ou algoritmo adequado. Em algumas modalidades, percentual de identidade é calculado por FastDB com base nos seguintes parâmetros: penalidade de incompatibilidade de 1; penalidade de *gap* de 1; penalidade de extensão de *gap* de 0,33; e penalidade de junção de 30.

[058] Um exemplo de um algoritmo útil é o PILEUP. O PILEUP cria um alinhamento de sequências múltiplas de um grupo de sequências relacionadas utilizando alinhamentos progressivos emparelhados. O algoritmo também pode esboçar uma árvore mostrando as relações de agrupamento utilizadas para criar o alinhamento. Um exemplo não limitativo de parâmetros de PILEUP inclui um peso de *gap* padrão de 3,00, um peso de extensão de *gap* padrão de 0,10 e *gaps* terminais ponderados.

[059] Outro exemplo de um algoritmo útil é o algoritmo BLAST. Um exemplo não limitativo de um programa de BLAST é o programa WU-BLAST-2. O WU-BLAST-2 utiliza vários parâmetros de pesquisa, muitos dos quais são configurados, por exemplo, para os valores padrão. Os parâmetros ajustáveis são configurados, por exemplo, com os seguintes valores: amplitude de sobreposição = 1, fração de sobreposição = 0,125, limiar de palavras (T) = 11. Os parâmetros de HSP S e os HSP S2 são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo próprio programa dependendo da composição da sequência e composição particular do

banco de dados particular contra o qual a sequência de interesse está sendo pesquisada. Os valores podem ser ajustados para aumentar a sensibilidade.

[060] Um algoritmo útil adicional é o BLAST aberto. O BLAST aberto utiliza pontuações de substituição de BLOSUM-62; parâmetro T limiar configurado para 9; o método *two-hit* para desencadear extensões fechadas, cargas de extensões de *gap* de k um custo de 10+k; Xu definido como 16 e Xg definido como 40 para o estágio de pesquisa do banco de dados e como 67 para o estágio de saída dos algoritmos. Os alinhamentos abertos são desencadeados por uma pontuação correspondente a, por exemplo, cerca de 22 *bits*.

[061] Uma ferramenta útil adicional é o Clustal, uma série de programas de computador comumente utilizada para alinhamento de sequências múltiplas. As versões recentes do Clustal incluem ClustalW, ClustalX e Clustal Omega. Os parâmetros padrão para alinhamentos em pares e cálculo de percentual de identidade de sequências de proteínas utilizando o método Clustal são KTUPLE = 1, GAP PENALTY = 3, WINDOW = 5 e DIAGONALS SAVED = 5. Para ácidos nucleicos estes parâmetros são KTUPLE = 2, GAP PENALTY = 5, WINDOW = 4 e DIAGONALS SAVED = 4.

[062] As mutações podem ser instaladas em sítios escolhidos ou aleatoriamente. Por exemplo, a mutagênese aleatória em um código ou região alvo pode fornecer mutantes para serem triados para uma atividade. As técnicas para fabricar mutações de substituição em sítios predeterminados no DNA tendo uma sequência conhecida incluem, por exemplo, mutagênese de iniciador M13 e mutagênese de PCR. A triagem dos mutantes pode ser realizada, por exemplo, utilizando os ensaios descritos na presente invenção.

[063] As substituições de aminoácidos podem ser de um único ou múltiplos resíduos. As inserções podem ser, por exemplo, de cerca de 1 a cerca de 20 resíduos de aminoácidos, ou mais. As deleções podem ser, por exemplo, de cerca

de 1 a cerca de 20 resíduos de aminoácidos, ou mais. As substituições, deleções, inserções ou qualquer combinação destas pode ocorrem no composto da amostra.

Porções que ligam ST2

[064] O ST2 (receptor tipo 1 de interleucina 1) é um receptor de citocina ligado à membrana e um membro da família de receptores de IL-1. O ST2 humano consiste em um domínio extracelular (ECD) de 310 aminoácidos (aa) com três domínios semelhantes a Ig, um segmento transmembrana de 21 aa, e um domínio citoplasmático de 207 aa com um domínio TIR intracelular (Tominaga, S. *et al.*, 1992, Biochim. Biophys. Acta 1171: 215; e Li, H. *et al.*, 2000, Genomics 67: 284.). O ST2 se liga à IL-33 e heterodimeriza com a proteína acessória receptor de IL-1 (1RAcP). Em algumas modalidades, um composto da presente invenção compreende uma porção de ligação que se liga a ST2. Uma porção que se liga a ST2 pode ser um polipeptídeo compreendendo o comprimento total de IL-33 de tipo selvagem, mais curto ou mais longo. A porção de ligação a ST2 pode ter uma sequência de IL-33 de tipo selvagem, como mostrado em SEQ ID NO: 10 (SITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNESGD GVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCVSFECK TDPGVFIGVKDNHLALIKVDSSENLCTENILFKLSET) ou pode ser uma variante de IL-33. As variantes de IL-33 podem conter uma ou mais substituições, deleções ou inserções que se desviam da sequência de aminoácidos de IL-33 de tipo selvagem. Os resíduos são designados na presente invenção pelo código de aminoácido de uma letra seguido pela posição de aminoácido de IL-33. As substituições são designadas na presente invenção pelo código de aminoácido de uma letra seguido pela posição de aminoácido de IL-33 seguida pela substituição do código de aminoácido de uma letra. Em algumas modalidades,

uma sequência de IL-33 é uma sequência de IL-33 humana, por exemplo, de resíduos 112 a 170 da sequência de tipo selvagem.

[065] Os compostos da presente invenção podem ter afinidade aumentada ou dinimuída para ST2 ou para o complexo receptor ST2- 1RAcP. Alguns compostos podem ter afinidade aumentada para ST2. Outros compostos podem ter afinidade reduzida para 1RAcP, o que levaria à capacidade reduzida para ativar o receptor de IL-33. Os compostos aqui podem exibir estabilidade ou efeito biológico melhorados em comparação com IL-33 de tipo selvagem.

[066] As variantes de IL-33 podem ser geradas com afinidade alterada para as subunidades ST2 ou IL1RAcP do receptor de IL-33. Em algumas modalidades, uma sequência de aminoácidos de IL-33 pode ser mutada em uma ou mais das seguintes posições em relação à sequência de IL-33 de tipo selvagem: E119, Y122, D131, E144, Y146, D149, Y163, H246, N222 e N226. Em algumas modalidades, substituições de aminoácido em um ou mais daquelas pode modular a afinidade de IL-33 para ST2. Em algumas modalidades, uma sequência de aminoácidos de IL-33 pode ser mutada para alterar os contatos com IL1RAcP: H168, N171, E200, H201, H224, D244, K 251 e E261 (todos em relação à sequência de IL-33 de tipo selvagem). Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido em um ou mais daqueles pode modular a afinidade de IL-33 para IL1RAcP, e assim modular a capacidade para ativar o receptor.

[067] Em algumas modalidades, uma porção de ligação a ST2 compreende uma variante de IL-33 compreendendo, por exemplo, uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60 %, pelo menos 61 %, pelo menos 62 %, pelo menos 63 %, pelo menos 64 %, pelo menos 65 %, pelo menos 66 %, pelo menos 67 %, pelo menos 68 %, pelo menos 69 %, pelo menos 70 %, pelo menos 71 %, pelo menos 72 %, pelo menos 73 %, pelo menos 74 %, pelo menos 75 %, pelo menos 76 %, pelo menos 77 %, pelo menos 78 %, pelo menos 79 %, pelo menos

80 %, pelo menos 81 %, pelo menos 82 %, pelo menos 83 %, pelo menos 84 %, pelo menos 85 %, pelo menos 86 %, pelo menos 87 %, pelo menos 88 %, pelo menos 89 %, pelo menos 90 %, pelo menos 91 %, pelo menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-33 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 10). Os compostos aqui incluem IL-33 variantes compreendendo uma sequência de aminoácidos que é 60 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-33 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 10), por exemplo, uma sequência de aminoácidos que é 80 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-33 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 10), uma sequência de aminoácidos que é 85 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-33 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 10), uma sequência de aminoácidos que é 90 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-33 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 10), ou uma sequência de aminoácidos que é 95 % a 99 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-33 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 10). Em algumas modalidades, uma porção de ligação a ST2 é 100 % idêntica à sequência de aminoácidos de IL-33 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 10).

[068] Os ligantes de ligação ao ST2 podem incluir anticorpos e fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno com afinidade de ligação para ST2. Como utilizado na presente invenção, um “anticorpo” é uma proteína que inclui pelo menos uma região determinante complementar que se liga a um antígeno alvo específico, por exemplo, ST2. Um anticorpo frequentemente inclui pelo menos uma região variável de imunoglobulina, por exemplo, uma sequência de aminoácidos que fornece um domínio variável de imunoglobulina ou sequência de domínio variável de imunoglobulina. Por exemplo, um anticorpo pode incluir uma região variável de cadeia pesada (H) (na presente invenção abreviada como VH), e uma região variável de cadeia leve (L) (na presente invenção abreviada

como VL). Em outro exemplo, um anticorpo inclui duas regiões variáveis de cadeia pesada (H) e duas regiões variáveis de cadeia leve (L). As cadeias leves da imunoglobulina podem ser de tipos kappa ou lambda. Por exemplo, um anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal, um anticorpo modificado, um anticorpo quimérico, um anticorpo transformado ou um anticorpo humanizado. O termo “anticorpo monoclonal”, como utilizado na presente invenção, refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contêm apenas uma espécie de um sítio de ligação ao antígeno capaz de imunorreagir com um epítopo particular. Os anticorpos podem ser obtidos de fontes comerciais ou produzido utilizando métodos conhecidos. O anticorpo pode ser qualquer tipo de imunoglobulina, por exemplo, IgG, IgM, IgY, IgA1, IgA2, IgD ou IgE. Em uma modalidade, o anticorpo pode ser um anticorpo humano.

[069] Fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno adequados para a utilização na invenção incluem, mas não estão limitados a, um fragmento Fab, um fragmento F(ab’)2, um fragmento Fd, um fragmento Fv, um fragmento dAb, Fv de cadeia única, um fragmento (*diabody*) região variável dimerizada (região V), um fragmento da região V estabilizado por dissulfeto (dsFv), *affibodies*, miméticos de anticorpo e uma ou mais regiões determinantes de complementaridade isoladas (CDR) que retêm a ligação específica a *payload*, por exemplo, ST2. Como utilizado na presente invenção, uma CDR “isolada” é uma CDR não no contexto de um anticorpo de ocorrência natural.

[070] Os anticorpos policlonais podem ser preparados imunizando-se um indivíduo adequado com uma proteína da invenção como um imunógeno. O título do anticorpo no indivíduo imunizado pode ser monitorado com o passar do tempo por técnicas padrão, tais como com um ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) utilizando polipeptídeo imobilizado. Em um tempo apropriado depois da imunização, por exemplo, quando o título dos anticorpos

específicos é mais alto, as células produtoras de anticorpos podem ser obtidas do indivíduo e utilizadas para preparar anticorpos monoclonais (mAb) por técnicas padrão, tais como a técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256: 495 - 497, a técnica de hibridoma de células B humanas (ver Kozbor *et al.,* 1983, *Immunol. Today* 4: 72), a técnica de EBV-hibridoma (ver Cole *et al.*, páginas 77 - 96 Em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 1985) ou técnicas de trioma. A tecnologia para produzir hibridomas é bem conhecida (ver, geralmente, *Current Protocols in Immunology,* Coligan *et al.* ed., John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1994). As células de hibridoma que produzem um anticorpo monoclonal da invenção são detectadas por triagem dos sobrenadantes da cultura de hibridoma para anticorpos que se ligam ao polipeptídeo de interesse (isto é, ST2), por exemplo, utilizando um ensaio ELISA padrão.

[071] A alternativa para preparar hibridomas que secretam anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal dirigido contra ST2 pode ser identificado e isolado triando-se uma biblioteca de imunoglobulina combinatória recombinante (por exemplo, uma biblioteca de exibição de fago de anticorpo) com o polipeptídeo de interesse. Os kits para gerar e triar bibliotecas de exibição de fagos estão comercialmente disponíveis (por exemplo, a Farmácia *Recombinant Phage Antibody System*, Catálogo Nº 27-9400-01; e a Stratagene *SurfZAP Phage Display Kit*, Catálogo Nº 240612). Adicionalmente, exemplos de métodos e reagentes particularmente acessíveis para a utilização na geração e triagem de biblioteca de exibição de anticorpo podem ser encontrados em, por exemplo, Patente U.S. Nº 5,223,409; Publicação PCT Nº WO 92/18619; Publicação PCT Nº WO 91/17271; Publicação PCT Nº WO 92/20791; Publicação PCT Nº WO 92/15679; Publicação PCT Nº WO 93/01288; Publicação PCT Nº WO 92/01047; Publicação PCT Nº WO 92/09690; Publicação PCT Nº WO 90/02809; Fuchs *et al.*

(1991) *Bio/Technology* 9: 1370 - 1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81 - 85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246: 1275- 1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 725 - 734.

[072] Os anticorpos recombinantes que se ligam especificamente a ST2 também podem ser preparados. Os anticorpos recombinantes incluem, mas não estão limitados a anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados, compreendendo porções humanas e não humanas, anticorpos de cadeia única e anticorpos multi-específicos. Um anticorpo quimérico é uma molécula em que diferentes porções são derivadas de diferentes espécies de animais, tais como aquelas tendo uma região variável derivada de um mAb murino e uma região constante de imunoglobulina humana. (Ver, por exemplo, Cabilly *et al.*, Patente U.S. Nº 4,816,567; e Boss *et al.*, Patente U.S. Nº 4,816,397, que são incorporados na presente invenção por referência em sua totalidade.) Anticorpos de cadeia única têm um sítio de ligação ao antígeno e consistem em um único polipeptídeo. Eles podem ser produzidos por técnicas conhecidas na arte, por exemplo, utilizando os métodos descritos em Ladner *et. al.* Pat. U.S. Nº 4,946,778 (que é aqui incorporado por referência em sua totalidade); Bird *et al.*, (1988) *Science* 242: 423 - 426; Whitlow *et al.*, (1991) *Methods in Enzymology* 2: 1 - 9; Whitlow *et al.*, (1991) *Methods in Enzymology* 2: 97 - 105; e Huston *et al.*, (1991) *Methods in Enzymology Molecular Desing e Modeling: Concepts and Applications* 203: 46 - 88.

[073] Os anticorpos humanizados são moléculas de anticorpo de espécies não humanas tendo uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da espécie não humana e uma região de estrutura de uma molécula de imunoglobulina humana. (Ver, por exemplo, Queen, Patente U.S. Nº 5,585,089, que é incorporada na presente invenção por referência em sua totalidade.) Os anticorpos monoclonais humanizados podem ser produzidos por técnicas de

DNA recombinante conhecidas na técnica, por exemplo, utilizando os métodos descritos na Publicação PCT Nº WO 87/02671; Pedido de Patente Europeia 184,187; Pedido de Patente Europeia 171,496; Pedido de Patente Europeia 173,494; Publicação PCT Nº WO 86/01533; Patente U.S. Nº 4,816,567; Pedido de Patente Europeia 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240: 1041 - 1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439 - 3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 3521 - 3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214 - 218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47: 999 - 1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314: 446 - 449; e Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553 - 1559); Morrison (1985) *Science* 229:1202 - 1207; Oi *et al.* (1986) *Bio/Techniques* 4: 214; Patente U.S. 5.225.539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 552 - 525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239: 1534; e Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141: 4053 - 4060.

[074] Mais particularmente, os anticorpos humanizados podem ser produzidos, por exemplo, utilizando camundongos transgênicos que são incapazes de expressar genes de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina endógena, mas que podem expressar genes de cadeia pesada e leve humanos. Os camundongos transgênicos são imunizados na forma normal com um antígeno selecionado, por exemplo, ST2. Os anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno podem ser obtidos utilizando tecnologia de hibridoma convencional. Os transgenes de imunoglobulina humana abrigados pelos camundongos transgênicos rearranjam-se durante a diferenciação de células B, e subsequentemente, sofrem comutação de classe e mutação somática. Assim, utilizando tal técnica, é possível produzir anticorpos IgG, IgA e IgE. Para uma visão geral desta tecnologia para produzir anticorpos humanos, ver Lonberg e Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13: 65 - 93). Para um debate detalhado desta tecnologia para produzir anticorpos humanos e anticorpos monoclonais humanos e protocolos para produzir tais anticorpos, ver, por exemplo, Patente U.S.

5,625,126; Patente U.S. 5,633,425; Patente U.S. 5,569,825; Patente U.S. 5,661,016; e Patente U.S. 5,545,806. Além disso, as empresas podem ser contratadas para fornecer anticorpos humanos dirigidos contra um antígeno selecionado (por exemplo, ST2) utilizando tecnologia similar àquela descrita acima.

[075] Os anticorpos completamente humanos que reconhecem ST2 podem ser gerados utilizando uma técnica referida como "seleção guiada". Neste método, um anticorpo monoclonal não humano selecionado, por exemplo, de um anticorpo murino, é utilizado para guiar a seleção de um anticorpo completamente humano que reconhece o mesmo epítopo (Jespers *et al.,* 1994, *Bio/technology* 12: 899 - 903).

[076] Os anticorpos contra ST2 podem ser isolados depois da produção (por exemplo, do sangue ou do soro do indivíduo) ou da síntese e depois purificados por técnicas bem conhecidas. Por exemplo, anticorpos IgG podem ser purificados utilizando cromatografia de proteína A. Os anticorpos específicos para ST2 podem ser selecionados ou (por exemplo, parcialmente purificados) ou purificados por, por exemplo, cromatografia de afinidade. Por exemplo, uma proteína de ST2 recombinantemente expressada e purificada (ou parcialmente purificada) é produzida, e acoplada covalentemente ou não covalentemente a um suporte sólido tal como, por exemplo, uma coluna de cromatografia. A coluna pode então ser utilizada para purificar por afinidade anticorpos específicos para ST2 de uma amostra contendo anticorpos dirigida contra um grande número de diferentes epítopos, gerando assim uma composição de anticorpos substancialmente purificados, isto é, um que é substancialmente livre de anticorpos contaminantes.

[077] Os anticorpos que se ligam a ST2 são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, US2017/0002079 descreve uma gama de anticorpos de ligação a ST2

(por exemplo, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4 e Ab12-Ab36) dirigidos contra ST2 humano que foram preparados utilizando tecnologia XENOMOUSE® (Pat. U.S. Nºs 6,114,598; 6,162,963; 6,833,268; 7,049,426; 7,064,244, que são incorporadas na presente invenção por referência em sua totalidade; Green *et al.*, 1994, Nature Genetics 7: 13 - 21; Mendez *et al.*, 1997, Nature Genetics 15: 146 - 156; Green e Jakobovitis, 1998, J. Ex. Med. 188: 483 - 495, Kellermann e Green, 2002, Current Opinion in Biotechnology, 13: 593 - 597). Ver, em particular, Exemplo 2 da US2017/0002079, que é incorporada na presente invenção por referência em sua totalidade. Os anticorpos anti-ST2 dirigidos contra ST2 humano também são descritos em WO2012/113813 (por exemplo, anticorpo monoclonal ral70) e na Pat. U.S. Nº 7087396 (por exemplo, anticorpos monoclonais 2A5, FB9 e HB12), cada uma das quais são incorporadas na presente invenção por referência em sua totalidade. Por exemplo, Pat. U.S. Nº 7087396 descreve a preparação de anticorpos monoclonais dirigidos a ST2 humano no Exemplo 1. Os anticorpos de ligação a ST2 também estão comercialmente disponíveis (por exemplo, R&D Systms, Inc., Minneapolis, MN, Cat. Nºs MAB523 e AF523). MAB523 é um anticorpo IgG1 monoclonal de camundongo que detecta ST2 humano. AF523 é uma IgG1 policlonal purificada por afinidade ao antígeno de cabra que detecta ST2 humano.

Ligação entre uma porção de ligação a IL-2R e uma porção de ligação a ST2

[078] As porções de ligação a IL-2R e ST2 estão ligadas. Uma primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e uma segunda porção que se liga ao ST2 estão ligadas covalentemente ou não covalentemente. Em algumas modalidades, a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e a segunda porção que se liga ao ST2 estão covalentemente ligadas. Por exemplo, a primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e a segunda porção que se liga ao ST2 podem estar covalentemente ligadas por uma ligação de sulfeto ou uma ligação de dissulfeto.

Em algumas modalidades, um composto compreendendo uma primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e uma segunda porção que se liga ao ST2 compreende uma porção de multimerização ou duas porções de multimerização, por exemplo, domínios Fc. Por exemplo, uma primeira porção de multimerização pode estar covalentemente ligada à primeira porção que se liga ao receptor de IL-2 e uma segunda porção de multimerização pode estar covalentemente ligada à segunda porção que se liga ao ST2. As duas porções de multimerização também podem estar covalentemente ligadas uma à outra. Em algumas modalidades, as duas porções de multimerização são sequências polipeptídicas. Por exemplo, em algumas modalidades, uma ligação de dissulfeto liga covalentemente um primeiro domínio Fc que está covalentemente ligado à porção de ligação a IL-2R a e um segundo domínio Fc que está covalentemente ligado à porção de ligação a ST2.

Domínios Fc de imunoglobulina

[079] Em algumas modalidades, uma porção de multimerização é um domínio Fc de imunoglobulina, por exemplo, um domínio Fc de imunoglobulina que é deficiente em funções efetoras em relação a um domínio Fc de imunoglobulina de tipo selvagem correspondente. Exemplos não limitativos de domínios Fc de imunoglobulina são domínios Fc de imunoglobulina IgG, IgA, IgD, IgM e IgE. Em algumas modalidades, um domínio Fc de imunoglobulina é um domínio Fc de imunoglobulina IgG1.

[080] Os domínios Fc de imunoglobulina têm vários benefícios terapêuticos quando incorporados em proteínas de fusão. Por exemplo, os domínios Fc de imunoglobulina podem aumentar a meia-vida circulante da proteína parceira de fusão. Em algumas modalidades, o aumento da meia-vida circulante é devido ao domínio Fc evitando a agregação da proteína de fusão, aumentado assim sua estabilidade e diminuindo a depuração.

[081] As quatro subclasses de IgG humanas se diferem nas funções efetoras (CDC, ADCC), meia-vida circulante e estabilidade. A IgG1 possui funções efetoras de Fc, e é a subclasse de IgG mais abundante. A IgG2 é deficiente nas funções efetoras de Fc, mas está sujeita à dimerização com outras moléculas de IgG2 e instabilidade devido à desordem das ligações de dissulfeto na região de dobradiça. A IgG3 possui funções efetoras de Fc, e tem uma região de dobradiça longa e rígida. A IgG4 é deficiente nas funções efetoras de Fc, e tem uma meia-vida circulante mais curta que as outras subclasses. O dímero de IgG4 é bioquimicamente instável devido a ter apenas uma única ligação de dissulfeto na região de dobradiça levando à troca de cadeias de H entre diferentes moléculas de IgG4. As modificações na sequência de Fc podem ser feitas na região de dobradiça de um Fc de IgG2 para evitar a agregação, ou na região de dobradiça de um Fc de IgG4 para estabilizar os dímeros.

[082] As variantes deficientes na função efetora de IgGl podem ser geradas. Por exemplo, uma substituição de aminoácido pode ser feita na posição N297, a localização de um sítio de glicosilação ligado a N. Em algumas modalidades, a substituição é N297A. Substituição deste resíduo de asparagina remove o sítio de glicosilação e reduz significativamente a citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC) e a atividade de citotoxicidade dependente de complemento (CDC), evitando assim a lise celular indesejada.

[083] Várias outras variantes de IgG1 deficientes na função efetora também podem ser avaliadas pelo técnico no assunto. Um exemplo não limitativo de tal variante é IgGl(L234F/L235E/P331S), que muda os aminoácidos nos sítios de ligação Clq e FcyR. Essas variantes de Fc (ou similares) podem ser utilizadas para gerar agonista seletivo de IL-2 deficiente de efetor e estável - proteínas de fusão Fc (IL2SA-Fc). Formas de porções de proteína Fc também podem ser manipuladas para criar monômeros estáveis ao invés de dímeros. Essas porções de proteína

Fc modificadas também podem ser combinadas com um composto IL-2 da presente invenção. Adicionalmente, um heterodímero de funcionalidade monomérica compreendendo um polipeptídeo de cadeia de H de IL-2-Fc pode ser combinado com um polipeptídeo de cadeia de H de Fc e agregado utilizando tecnologia de anticorpo biespecífico com um agonista seletivo de IL-2. As proteínas de fusão Fc de IL-2 também podem ser feitas com moléculas de anticorpo IgG intactas, com ou sem especificidade para o antígeno na porção IgG. Além disso, as variantes de Fc que carecem de alguma região de dobradiça podem ser utilizadas com os compostos e métodos descritos na presente invenção.

[084] Em algumas modalidades, a sequência de uma porção Fc de imunoglobulina é uma porção Fc de IgG1 compreendendo uma mutação N297A, por exemplo, a sequência mostrada abaixo: DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 7; a mutação N297A é mostrada em negrito e sublinhado).

[085] Em algumas modalidades, a porção Fc de IgG1 tem pelo menos 60 %, pelo menos 61 %, pelo menos 62 %, pelo menos 63 %, pelo menos 64 %, pelo menos 65 %, pelo menos 66 %, pelo menos 67 %, pelo menos 68 %, pelo menos 69 %, pelo menos 70 %, pelo menos 71 %, pelo menos 72 %, pelo menos 73 %, pelo menos 74 %, pelo menos 75 %, pelo menos 76 %, pelo menos 77 %, pelo menos 78 %, pelo menos 79 %, pelo menos 80 %, pelo menos 81 %, pelo menos 82 %, pelo menos 83 %, pelo menos 84 %, pelo menos 85 %, pelo menos 86 %, pelo menos 87 %, pelo menos 88 %, pelo menos 89 %, pelo menos 90 %, pelo menos 91 %, pelo menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, pelo menos

95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

[086] O composto da presente invenção pode ser produzido sob condições que permitem que dois polipeptídeos de Ig formem um domínio Fc. Os dois polipeptídeos de Ig podem ser conjugados com diferentes porções. Em alguns casos, um polipeptídeo de IgG é conjugado com uma porção IL-2 e o segundo polipeptídeo de Ig está ligado a uma porção que se liga a uma proteína de superfície celular exceto o receptor de IL2. Em algumas modalidades a proteína de superfície celular ligada pela porção de ligação é ST2.

Ligante

[087] A ligação na junção entre um domínio Fc e uma porção de ligação ao receptor de IL2 a ou uma porção de ligação ao ST2 pode ser: (1) uma fusão direta das duas sequências de proteínas; (2) uma fusão com um peptídeo ligante de intervenção; ou (3) uma fusão por uma porção não peptídica. Em algumas modalidades, um ligante liga diretamente uma porção de ligação ao IL2R e uma porção de ligação a ST2. Os peptídeos ligantees podem estar incluídos como espaçadores entre duas porções de proteínas. Os peptídeos ligantees podem promover dobragem, estabilidade, expressão e bioatividade apropriadas de proteína das porções de proteínas componentes. Os peptídeos ligantees longos flexíveis podem ser compostos por glicina, serina ou treonina, com múltiplos resíduos de glicina fornecendo uma conformação altamente flexível. Os resíduos de serina ou treonina fornecem área de superfície polar para limitar a interação hidrofóbica dentro do peptídeo ou com as porções de proteína de fusão componente. Em algumas modalidades, os ligantees peptídicos são ricos em glicina e serina, tais como repetições da sequência GGGGS (SEQ ID NO: 31). Em algumas modalidades, um peptídeo ligante tem uma sequência de $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 31), em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em algumas modalidades,

n é 3; isto é, um peptídeo ligante tem uma sequência de GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). Em algumas modalidades, a porção de ligação ao receptor de IL-2 é N-terminal ao peptídeo ligante, e o domínio Fc de imunoglobulina é C-terminal ao peptídeo ligante. Em algumas modalidades, a porção de ligação ao receptor de IL-2 é C-terminal ao peptídeo ligante, e o domínio Fc de imunoglobulina é N-terminal ao peptídeo ligante.

[088] Em algumas modalidades, o peptídeo ligante tem pelo menos 60 %, pelo menos 61 %, pelo menos 62 %, pelo menos 63 %, pelo menos 64 %, pelo menos 65 %, pelo menos 66 %, pelo menos 67 %, pelo menos 68 %, pelo menos 69 %, pelo menos 70 %, pelo menos 71 %, pelo menos 72 %, pelo menos 73 %, pelo menos 74 %, pelo menos 75 %, pelo menos 76 %, pelo menos 77 %, pelo menos 78 %, pelo menos 79 %, pelo menos 80 %, pelo menos 81 %, pelo menos 82 %, pelo menos 83 %, pelo menos 84 %, pelo menos 85 %, pelo menos 86 %, pelo menos 87 %, pelo menos 88 %, pelo menos 89 %, pelo menos 90 %, pelo menos 91 %, pelo menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Composições farmacêuticas

[089] Uma composição farmacêutica da invenção pode compreender qualquer composto descrito na presente invenção. Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreende um composto da presente invenção com outros componentes químicos, tais como carreadores, estabilizadores, diluentes, agentes dispersantes, agentes de suspensão, agentes espessantes e/ou excipientes. A composição farmacêutica facilita a administração de um composto da presente invenção a um organismo. As composições farmacêuticas podem ser administradas em quantidades terapeuticamente eficazes como composições farmacêuticas por várias formas e vias incluindo, por exemplo,

administração intravenosa, subcutânea, intramuscular, oral, parenteral, oftálmica, subcutânea, transdérmica, nasal, vaginal e tópica.

[090] Uma composição farmacêutica pode ser administrada de uma maneira local, por exemplo, via injeção do composto diretamente em um órgão, opcionalmente em um depósito ou formulação de liberação sustentada ou implante. As composições farmacêuticas podem ser fornecidas na forma de uma formulação de liberação rápida, na forma de uma formulação de liberação prolongada, ou na forma de uma formulação de liberação intermediária. Uma forma de liberação rápida pode fornecer uma liberação imediata. Uma formulação de liberação prolongada pode fornecer uma liberação controlada ou uma liberação retardada sustentada.

[091] Para a administração oral, as composições farmacêuticas podem ser formuladas combinando-se um composto da presente invenção com carreadores ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Tais carreadores podem ser utilizados para formular líquidos, géis, xaropes, elixires, pastas ou suspensões, para ingestão oral por um indivíduo. Exemplos não limitativos de solventes utilizados em uma formulação dissolúvel oral podem incluir água, etanol, isopropanol, solução salina, solução salina fisiológica, DMSO, dimetilformamida, tampão fosfato de potássio, solução salina tamponada com fosfato (PBS), tampão fosfato de sódio, tampão ácido 4-2-hidróxietil-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES), tampão ácido 3-(N-morfolino)propanossulfônico (MOPS), tampão piperazina-*N*,*N*'-bis(ácido 2-etanossulfônico) (PIPES) e solução salina tamponada de citrato de sódio (SSC). Exemplos não limitativos de co-solventes utilizados em uma formulação dissolúvel oral podem incluir sacarose, ureia, *cremaphor*, DMSO e tampão fosfato de potássio.

[092] As preparações farmacêuticas podem ser formuladas para

administração intravenosa. As composições farmacêuticas podem estar em uma forma adequada para injeção parenteral como uma suspensão estéril, solução ou emulsão em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes formuladores tais como agentes de suspensão, estabilizantes e/ou dispersantes. As formulações farmacêuticas para administração parenteral incluem soluções aquosas de um composto da presente invenção na forma solúvel em água. As suspensões de um composto da presente invenção podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosas. Os solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos tais como óleo de gergelim ou ésteres de ácido graxo sintéticos, tais como oleato de etila ou triglicerideos, ou lipossomas. A suspensão também pode conter estabilizadores ou agentes adequados que aumentam a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas. Alternativamente, o princípio ativo pode estar na forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água estéril livre de pirogênio, antes da utilização.

[093] Um composto da presente invenção pode ser administrado topicamente e pode ser formulado em uma variedade de composições administráveis topicamente, tais como soluções, suspensões, loções, géis, pastas, bastões medicados, bálsamos, cremes e unguentos. Tais composições farmacêuticas podem conter solubilizantes, estabilizadores, agentes realçadores de tonicidade, tampões e conservantes.

[094] Um composto da presente invenção também pode ser formulado em composições retais tais como enemas, géis retais, espumas retais, aerossóis retais, supositórios, supositórios gelatinosos ou enemas de retenção, contendo bases de supositório convencionais tais como manteiga de cacau ou outros glicéridos, bem como polímeros sintéticos tais como polivinilpirrolidona e PEG. Nas formas de supositório das composições, uma cera de baixo ponto de fusão

tal como uma mistura de glicerídeos de ácido graxo, opcionalmente em combinação com manteiga de cacau, pode estar fundida.

[095] Na prática dos métodos de tratamento ou utilização aqui fornecidos, quantidades terapeuticamente eficazes dos compostos descritos na presente invenção são administradas em composições farmacêuticas a um indivíduo tendo uma doença ou condição a ser tratada. Em algumas modalidades, o indivíduo é um mamífero tal como um humano. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode variar amplamente dependendo da severidade da doença, idade e saúde relativa do indivíduo, a potência dos compostos utilizados e outros fatores. Os compostos podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com um ou mais agentes terapêuticos como componentes de misturas.

[096] As composições farmacêuticas podem ser formuladas utilizando um ou mais carreadores fisiologicamente aceitáveis compreendendo excipientes e auxiliares, que facilitam o processamento de um composto da presente invenção em preparações que podem ser utilizadas farmaceuticamente. A formulação pode ser modificada dependendo da via de administração escolhida. As composições farmacêuticas compreendendo um composto descrito na presente invenção podem ser fabricadas, por exemplo, por processos de mistura, dissolução, emulsificação, encapsulação, aprisionamento ou compressão.

[097] As composições farmacêuticas podem incluir pelo menos um portador, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável e os compostos descritos na presente invenção como forma de sal de base livre ou farmaceuticamente aceitável. As composições farmacêuticas podem conter solubilizantes, estabilizadores, agentes realçadores de tonicidade, tampões e conservantes.

[098] Os métodos para a preparação de composições compreendendo os compostos descritos na presente invenção incluem formular os compostos com

um ou mais excipientes ou carreadores farmaceuticamente aceitáveis inertes, para formar uma composição sólida, semi-sólida ou líquida. Composições sólidas incluem, por exemplo, pós, comprimidos, grânulos dispersíveis e cápsulas. Composições líquidas incluem, por exemplo, soluções em que um composto é dissolvido, emulsões compreendendo um composto, ou uma solução contendo lipossomas, micelas ou nanopartículas compreendendo um composto como divulgado na presente invenção. Composições semi-sólidas incluem, por exemplo, géis, suspensões e cremes. As composições podem ser em soluções ou suspensões líquidas, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em um líquido antes da utilização ou como emulsões. Estas composições também podem conter menores quantidades de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como agentes umectantes ou emulsificadores, agentes tamponantes de pH e outros aditivos farmaceuticamente aceitáveis.

[099] Exemplos não limitativos de formas de dosagem adequadas para a utilização na invenção incluem líquido, pó, gel, nanossuspensão, nanopartícula, microgel, suspensões aquosas ou oleosas, emulsão e qualquer combinação destes.

[0100] Exemplos não limitativos de excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados para a utilização na invenção incluem agentes de ligação, agentes desintegrantes, anti-aderentes, agentes anti-estáticos, tensoativos, anti-oxidantes, agentes de revestimento, agentes corantes, plasticizadores, conservantes, agentes de suspensão, agentes emulsificadores, agentes anti-microbianos, agentes de esferonização, e qualquer combinação destes.

[0101] Uma composição da invenção pode ser, por exemplo, uma formulação de liberação imediata ou uma formulação de liberação controlada. Uma formulação de liberação imediata pode ser formulada para permitir os compostos agirem rapidamente. Exemplos não limitativos de formulações de

liberação imediata incluem formulações facilmente dissolúveis. Uma formulação de liberação controlada pode ser uma formulação farmacêutica que foi adaptada tal que as taxas de liberação e perfis de liberação do princípio ativo podem ser combinados com as necessidades fisiológicas e cronoterapêuticas ou, alternativamente, foi formulada para efetuar a liberação de um agente ativo a uma taxa programada. Exemplos não limitativos de formulações de liberação controlada incluem grânulos, grânulos de liberação retardada, hidrogéis (por exemplo, de origem sintética ou natural), outros agentes gelificantes (por exemplo, fibras alimentares formadoras de gel), formulações à base de matriz (por exemplo, formulações compreendendo um material polimérico tendo pelo menos um ingrediente ativo disperso), grânulos dentro de uma matriz, misturas poliméricas e massas granulares.

[0102] Uma formulação de liberação controlada é uma formulação de liberação retardada. Uma formulação de liberação retardada pode ser formulada para retardar uma ação do composto por um período de tempo estendido. Uma formulação de liberação retardada pode ser formulada para retardar a liberação de uma dose eficaz de um ou mais compostos, por exemplo, por cerca de 4, cerca de 8, cerca de 12, cerca de 16 ou cerca de 24 horas.

[0103] Uma formulação de liberação controlada pode ser uma formulação de liberação sustentada. Uma formulação de liberação sustentada pode ser formulada para sustentar, por exemplo, a ação do composto durante um período de tempo estendido. Uma formulação de liberação sustentada pode ser formulada para fornecer uma dose eficaz de qualquer composto aqui descrito (por exemplo, fornecer um perfil de sangue fisiologicamente eficaz) durante cerca de 4, cerca de 8, cerca de 12, cerca de 16 ou cerca de 24 horas.

[0104] Exemplos não limitativos de excipientes farmaceuticamente aceitáveis podem ser encontrados, por exemplo, em Remington: The Science and

Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. e Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nova Iorque, N.Y., 1980; e Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Sétima Ed. (Lippincott Williams & Wilkins1999), cada um dos quais são incorporados na presente invenção por referência em sua totalidade.

[0105] Múltiplos agentes terapêuticos podem ser administrados em qualquer ordem ou simultaneamente. Em algumas modalidades, um composto da invenção é administrado em combinação com, antes ou depois de um antibiótico. Se simultaneamente, os múltiplos agentes terapêuticos podem ser fornecidos em uma única, forma unificada, ou em múltiplas formas, por exemplo, como múltiplas pílulas separadas. Os agentes podem ser empacotados juntos ou separadamente, em um único pacote ou em uma pluralidade de pacotes. Um ou todos os agentes terapêuticos podem ser fornecidos em múltiplas doses. Se não for simultânea, a temporização entre as múltiplas doses pode variar até cerca de um mês.

[0106] Agentes terapêuticos aqui descritos podem ser administrados antes, durante ou depois da ocorrência de uma doença ou condição, e a temporização para administrar a composição contendo um agente terapêutico pode variar. Por exemplo, as composições podem ser utilizadas como um profilático e podem ser administradas continuamente a indivíduos com uma propensão para condições ou doenças de modo a diminuir a probabilidade da ocorrência da doença ou condição. As composições podem ser administradas a um indivíduo durante ou o mais cedo possível após o início dos sintomas. A administração dos agentes terapêuticos pode ser iniciada dentro das primeiras 48 horas do início dos sintomas, dentro das primeiras 24 horas do início dos sintomas, dentro das

primeiras 6 horas do início dos sintomas ou dentro de 3 horas do início dos sintomas. A administração inicial pode ser através de qualquer via prática, tal como por qualquer via aqui descrita utilizando qualquer formulação aqui descrita. Um agente terapêutico pode ser administrado assim que é praticável depois do início de uma doença ou condição é detectada ou suspeita, e durante um tempo necessário para o tratamento da doença, tal como, por exemplo, de cerca de 1 mês a cerca de 3 meses. O período do tratamento pode variar para cada indivíduo.

[0107] As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser nas formas de dosagem unitária adequadas para administração única de dosagens precisas. Na forma de dosagem unitária, a formulação é dividida em doses unitárias contendo quantidades apropriadas de um ou mais compostos. A dosagem unitária pode ser na forma de um pacote contendo quantidades distintas da formulação. Exemplos não limitativos são injetáveis, frascos ou ampolas empacotados. Composições de suspensão aquosa podem ser empacotadas em recipientes não reutilizáveis de dose única. Os recipientes reutilizáveis de múltiplas doses podem ser utilizados, por exemplo, em combinação com ou sem um conservante. As formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas, ou em recipientes de múltiplas doses com um conservante.

[0108] As composições farmacêuticas fornecidas na presente invenção, podem ser administradas em conjunção com outras terapias, por exemplo, quimioterapia, radiação, cirurgia, agentes anti-inflamatórios e vitaminas selecionadas. Os outros agentes podem ser administrados antes de, depois de, ou concomitantemente com as composições farmacêuticas.

[0109] Dependendo do modo intencionado de administração, as composições farmacêuticas podem ser na forma de formas de dosagem sólidas,

semi-sólidas ou líquidas, tais como, por exemplo, comprimidos, supositórios, pílulas, cápsulas, pós, líquidos, suspensões, loções, cremes ou géis, por exemplo, em forma de dosagem unitária adequada para administração única de uma dosagem precisa.

[0110] Para as composições sólidas, carreadores sólidos não tóxicos incluem, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glicose, sacarose e carbonato de magnésio.

[0111] Exemplos não limitativos de formas de dosagem adequadas para a utilização na invenção incluem líquido, elixir, nanossuspensão, suspensões aquosas ou oleosas, gotas, xaropes, e qualquer combinação dos mesmos. Exemplos não limitativos de excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados para a utilização na invenção incluem agentes granuladores, agentes de ligação, agentes lubrificantes, agentes desintegrantes, agente adoçantes, deslizantes, anti-aderentes, agentes anti-estáticos, tensoativos, anti-oxidantes, gomas, agentes de revestimento, agentes corantes, agente flavorizantes, agentes de revestimento, plasticizadores, conservantes, agentes de suspensão, agentes emulsificadores, material celulósico vegetal e agentes de esferonização, e qualquer combinação dos mesmos.

[0112] Composições da invenção podem ser empacotadas como um kit. Em algumas modalidades, um kit inclui instruções escritas na administração/utilização da composição. O material escrito pode ser, por exemplo, um rótulo. O material escrito pode sugerir métodos de condições de administração. As instruções fornecem ao indivíduo e ao médico supervisor as melhores orientações para alcançar o resultado clínico ideal da administração da terapia. O material escrito pode ser um rótulo. Em algumas modalidades, o rótulo pode ser aprovado por uma agência reguladora, por exemplo, a U.S. Food

and Drug Administration (FDA), a European Medicines Agency (EMA), ou outras agências reguladoras.

Doenças

[0113] Os compostos da presente invenção podem ser aplicados a várias doenças ou condições autoimunes ou relacionadas ao sistema imunológico, por exemplo, para tratar tais doenças ou condições. Por exemplo, a presente invenção fornece um método para tratar uma condição, compreendendo o método administrar a um indivíduo em necessidade deste uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da presente invenção. Em algumas modalidades, o composto administrado ao indivíduo em necessidade deste compreende uma primeira porção que se liga a IL-2R e uma segunda porção que se liga a ST2, em que a primeira porção está covalentemente ligada por meio de um ligante a um primeiro domínio Fc e a segunda porção está covalentemente ligada por meio de um ligante a um segundo domínio Fc, e o primeiro e segundo domínios Fc estão covalentemente ligados, e ainda em que o primeiro e segundo domínios Fc são deficientes nas funções efetoras.

[0114] As doenças autoimunes incluem doenças que afetam órgãos tais como o coração, rim, fígado, pulmão, órgãos reprodutores, sistema digestivo ou pele. As doenças autoimunes incluem doenças que afetam glândulas, incluindo as glândulas endócrina, adrenal, tireoide, salivar e exócrina, e o pâncreas. As doenças autoimunes também podem ser multi-glandulares. As doenças autoimunes podem alvejar um ou mais tecidos, por exemplo, tecido conjuntivo, músculo ou sangue. As doenças autoimunes podem alvejar o sistema nervoso ou olhos, ouvidos ou sistema vascular. As doenças autoimunes também podem ser sistêmicas, afetando múltiplos órgãos, tecidos e/ou sistemas. Em algumas modalidades, uma doença ou condição relacionada ao sistema imunológico é uma doença ou condição inflamatória. Em algumas modalidades, uma doença

ou condição inflamatória é uma que envolve músculo, adiposo visceral, cólon e/ou tecido pulmonar inflamado.

[0115] Em certas modalidades, a doença autoimune é selecionada a partir do grupo que consiste em Doença do Enxerto contra Hospedeiro, Pênfigo Vulgar, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Esclerodermia, Colite Ulcerativa, Doença de Crohn, Psoríase, Diabetes Tipo 1, Esclerose Múltipla, Esclerose Lateral Amiotrófica, Alopecia Areata, Uveíte, Neuromielite Óptica e Distrofia Muscular de Duchenne.

[0116] Em algumas modalidades, os compostos da presente invenção tratam doenças que afetam o tecido muscular, por exemplo, miopatias inflamatórias, distrofias musculares, doenças musculares com envolvimento do sistema imunológico e doenças musculares envolvendo inflamação.

[0117] As miopatias inflamatórias são doenças que tipicamente envolvem inflamação dos músculos e sintomas associados, tais como fraqueza muscular. A fraqueza muscular pode ser progressiva. Os sintomas associados às miopatias inflamatórias (por exemplo, dermatomiosite) podem incluir, por exemplo, fraqueza muscular (por exemplo, fraqueza muscular proximal), erupção cutânea, fadiga depois de andar ou ficar em pé, tropeçar ou cair, disfagia, disfonia, dificuldade respiratória, dor muscular, músculos tenros, perda de peso, febre baixa, pulmões inflamados, sensibilidade à luz, depósitos de cálcio (calcinoses) sob a pele ou no músculo, e concomitantes biológicos de miopatias inflamatórias.

[0118] As miopatias inflamatórias podem ser causadas por reações alérgicas, outras doenças, exposição a um fármaco ou toxina, ou exposição a um agente infeccioso, ou pode ser idiopática (nenhuma causa conhecida). A miopatia inflamatória pode ser uma miopatia inflamatória aguda ou uma miopatia inflamatória crônica. As miopatias inflamatórias podem afetar tanto adultos quanto crianças (por exemplo, dermatomiosite juvenil). As miopatias

inflamatórias podem incluir sintomas que afetam outros órgãos ou sistemas do corpo, tais como a pele, pulmões, coração, olhos e sistema gastrointestinal. Em algumas modalidades, a miopatia inflamatória é uma miopatia inflamatória crônica (por exemplo, dermatomiosite, polimiosite ou miosite por corpos de inclusão).

[0119] Em algumas modalidades, a miopatia inflamatória pode ser causada por uma reação alérgica, outra doença (por exemplo, câncer ou uma doença do tecido conjuntivo), exposição a uma substância tóxica, um medicamento ou um agente infeccioso (por exemplo, um vírus). Em algumas modalidades, a miopatia inflamatória está associada ao lupus, artrite reumatoide ou esclerose sistêmica. Em algumas modalidades, a miopatia inflamatória é idiopática. Em algumas modalidades, a miopatia inflamatória é selecionada a partir de polimiosite, dermatomiosite, miosite por corpos de inclusão e miopatia necrotizante imunomediada. Em algumas modalidades, a miopatia inflamatória é dermatomiosite.

[0120] Concomitantes biológicos de miopatias inflamatórias (por exemplo, dermatomiosite) incluem, por exemplo, níveis alterados (por exemplo, aumentados) de citocinas (por exemplo, interferons Tipo I (tais como IFN-α e/ou IFN-β), interleucinas (tais como IL-6, IL-10, IL-15, IL-17 e IL-18), e TNF-α), TGF-β, fator de ativação de células B (BAFF) e superexpressão de genes induzidos por IFN (por exemplo, genes induzidos por IFN Tipo I). Outros concomitantes biológicos de miopatias inflamatórias podem incluir, por exemplo, um aumento da taxa de sedimentação de eritrócitos (ESR) e/ou níveis elevados de creatina quinase. Outros concomitantes biológicos de miopatias inflamatórias podem incluir autoanticorpos, por exemplo, autoanticorpos anti-sintetase (por exemplo, anticorpos anti-Jo1), anticorpos anti-partículas de reconhecimento de sinal (anti-SRP), anticorpos anti-Mi-2, anticorpos anti-p155, anticorpos anti-PM/Sci e

anticorpos anti-RNP.

[0121] As distrofias musculares são um grupo de diversos transtornos neuromusculares hereditários que representam um grupo de doenças neuromusculares devastadoras caracterizadas pelo envolvimento primário ou secundário do músculo esquelético. Exemplos de distrofias musculares incluem, mas não estão limitadas a Distrofia Muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular Facioescapulohumeral, distrofia muscular congênita de Fukuyama e distrofia muscular congênita deficiente em merosina. A forma mais comum de distrofia muscular é a Distrofia Muscular de Duchenne, (DMD). A DMD é um transtorno recessivo ligado a X caracterizado por uma mutação no gene que codifica a distrofina. A maioria dos pacientes morre antes de dos 30 anos devido à insuficiência respiratória ou cardíaca. A distrofia muscular de Becker (também conhecida como distrofia muscular pseudo-hipertrófica benigna) está relacionada à DMD pois ambas resultam de uma mutação no gene da distrofina. Um organismo sofrendo de DMD não produz distrofina funcional. Assim, a DMD é muito mais severa que a BMD.

Indivíduos

[0122] Os compostos da presente invenção são administrados a um indivíduo em necessidade deste, tal como um vertebrado. Em algumas modalidades o indivíduo é um camundongo, rato, coelho, cachorro, gato, cavalo, ovelha, vaca, macaco, macaco cinomologo ou humano. Os indivíduos podem ser, por exemplo, adultos idosos, adultos, adolescentes, pré-adolescentes, crianças, crianças pequenas e lactentes. Em algumas modalidades, o indivíduo é um modelo animal de uma miopatia inflamatória. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano com uma miopatia inflamatória, ou um ser humano com risco de desenvolvimento de uma miopatia inflamatória. Em algumas

modalidades, o indivíduo tem um histórico familiar de miopatia inflamatória. Em algumas modalidades o indivíduo carrega um gene associado a uma miopatia inflamatória. Em algumas modalidades o indivíduo é positivo para um biomarcador associado a uma miopatia inflamatória. Em algumas modalidades, o indivíduo foi diagnosticado com uma miopatia inflamatória. Em algumas modalidades, o indivíduo tem um ou mais sinais ou sintomas associados a uma miopatia inflamatória, por exemplo, um ou mais dos sintomas descritos na presente invenção.

[0123] Em algumas modalidades o indivíduo é um modelo animal de uma distrofia muscular. Em algumas modalidades o indivíduo é um ser humano com uma distrofia muscular ou um ser humano com risco de desenvolvimento de uma distrofia muscular. Em algumas modalidades, o indivíduo tem um histórico familiar de distrofia muscular. Em algumas modalidades o indivíduo carrega um gene associado a uma distrofia muscular. Em algumas modalidades o indivíduo é positivo para um biomarcador associado a uma distrofia muscular. Em algumas modalidades, o indivíduo foi diagnosticado com uma distrofia muscular. Em algumas modalidades, o indivíduo tem um ou mais sinais ou sintomas associados a uma distrofia muscular, por exemplo, um ou mais dos sintomas descritos na presente invenção.

Dosagem

[0124] As composições farmacêuticas descritas na presente invenção podem ser nas formas de dosagem unitária adequadas para administração única de dosagens precisas. Na forma de dosagem unitária, a formulação é dividida em doses unitárias contendo quantidades apropriadas de um ou mais compostos. A dosagem unitária pode ser na forma de um pacote contendo quantidades distintas da formulação. Exemplos não limitativos são líquidos em frascos ou ampolas. As composições de suspensão aquosa podem ser empacotadas em

recipientes não reutilizáveis de dose única. Os recipientes reutilizáveis de múltiplas doses podem ser utilizados, por exemplo, em combinação com um conservante. As formulações para injeção parenteral podem ser apresentadas na forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas, ou em recipientes de múltipas doses com um conservante.

[0125] Um composto descrito na presente invenção pode estar presente em uma composição em uma faixa de cerca de 0,5 μg a cerca de 7.000 μg, de cerca de 1 μg a cerca de 1.000 μg, de cerca de 1 μg a cerca de 250 μg, de cerca de 1 μg a cerca de 25 μg, de cerca de 5 μg a cerca de 50 μg, de cerca de 0,5 μg a cerca de 15 μg ou de cerca de 0,5 μg a cerca de 10 μg por dose.

[0126] Um composto descrito na presente invenção pode estar presente em uma composição em uma quantidade de cerca de 0,5 μg, cerca de 1 μg, cerca de 2 μg, cerca de 3 μg, cerca de 4 μg, cerca de 5 μg, cerca de 6 μg, cerca de 7 μg, cerca de 8 μg, cerca de 9 μg, cerca de 10 μg, cerca de 11 μg, cerca de 12 μg, cerca de 13 μg, cerca de 14 μg, cerca de 15 μg, cerca de 16 μg, cerca de 17 μg, cerca de 18 μg, cerca de 19 μg, cerca de 20 μg, cerca de 21 μg, cerca de 22 μg, cerca de 23 μg, cerca de 24 μg, cerca de 25 μg, cerca de 26 μg, cerca de 27 μg, cerca de 28 μg, cerca de 29 μg, cerca de 30 μg, cerca de 31 μg, cerca de 32 μg, cerca de 33 μg, cerca de 34 μg, cerca de 35 μg, cerca de 36 μg, cerca de 37 μg, cerca de 38 μg, cerca de 39 μg, cerca de 40 μg, cerca de 41 μg, cerca de 42 μg, cerca de 43 μg, cerca de 44 μg, cerca de 45 μg, cerca de 46 μg, cerca de 47 μg, cerca de 48 μg, cerca de 49 μg, cerca de 50 μg, cerca de 55 μg, cerca de 60 μg, cerca de 65 μg, cerca de 70 μg, cerca de 75 μg, cerca de 80 μg, cerca de 85 μg, cerca de 90 μg, cerca de 95 μg, cerca de 100 μg, cerca de 125 μg, cerca de 150 μg, cerca de 175 μg, cerca de 200 μg, cerca de 250 μg, cerca de 300 μg, cerca de 350 μg, cerca de 400 μg, cerca de 450 μg, cerca de 500 μg, cerca de 550 μg, cerca de 600 μg, cerca de 650 μg, cerca de 700 μg, cerca de 750 μg, cerca de 800 μg, cerca de

850 µg, cerca de 900 µg, cerca de 950 µg, cerca de 1.000 µg, cerca de 1050 µg, cerca de 1.100 µg, cerca de 1.150 µg, cerca de 1.200 µg, cerca de 1.250 µg, cerca de 1.300 µg, cerca de 1.350 µg, cerca de 1.400 µg, cerca de 1.450 µg, cerca de 1.500 µg, cerca de 1.550 µg, cerca de 1.600 µg, cerca de 1.650 µg, cerca de 1.700 µg, cerca de 1.750 µg, cerca de 1.800 µg, cerca de 1.850 µg, cerca de 1.900 µg, cerca de 1.950 µg, cerca de 2.000 µg, cerca de 2.500 µg, cerca de 3.000 µg, cerca de 3.500 µg, cerca de 4.000 µg, cerca de 4.500 µg, cerca de 5.000 µg, cerca de 5.500 µg, cerca de 6.000 µg, cerca de 6.500 µg, cerca de 7.000 µg, cerca de 7.500 µg, cerca de 8.000 µg, cerca de 9.000 µg, cerca de 10.000 µg (10 mg), cerca de 11 mg, cerca de 12 mg, cerca de 13 mg, cerca de 14 mg, cerca de 15 mg, cerca de 16 mg, cerca de 17 mg, cerca de 18 mg, cerca de 19 mg, cerca de 20 mg, cerca de 21 mg, cerca de 22 mg, cerca de 23 mg, cerca de 24 mg, cerca de 25 mg, cerca de 26 mg, cerca de 27 mg, cerca de 28 mg, cerca de 29 mg, cerca de 30 mg, cerca de 31 mg, cerca de 32 mg, cerca de 33 mg, cerca de 34 mg, cerca de 35 mg, cerca de 36 mg, cerca de 37 mg, cerca de 38 mg, cerca de 39 mg ou cerca de 40 mg. Qualquer um destes valores pode ser utilizado para definir uma faixa para a quantidade do composto na composição. Por exemplo, o composto pode estar presente em uma composição na faixa de cerca de 0,5 µg a cerca de 40 mg, de cerca de 500 µg a cerca de 10 mg ou de cerca de 50 µg a cerca de 5 mg.

[0127] Em algumas modalidades, uma dose pode ser expressada em termos de uma quantidade do fármaco dividida pela massa do indivíduo, por exemplo, microgramas ou miligramas de fármaco por quilogramas de massa corporal do indivíduo. Em algumas modalidades, o composto é administrado a uma dose de cerca de 0,5 µg/kg, cerca de 1 µg/kg, cerca de 2 µg/kg, cerca de 3 µg/kg, cerca de 4 µg/kg, cerca de 5 µg/kg, cerca de 6 µg/kg, cerca de 7 µg/kg, cerca de 8 µg/kg, cerca de 9 µg/kg, cerca de 10 µg/kg, cerca de 11 µg/kg, cerca de 12 µg/kg, cerca de 13 µg, cerca de 14 µg/kg, cerca de 15 µg/kg, cerca de 16 µg/kg, cerca

de 17 μg/kg, cerca de 18 μg/kg, cerca de 19 μg/kg, cerca de 20 μg/kg, cerca de 25 μg/kg, cerca de 30 μg/kg, cerca de 35 μg/kg, cerca de 40 μg/kg, cerca de 45 μg/kg, cerca de 50 μg/kg, cerca de 55 μg/kg, cerca de 60 μg/kg, cerca de 65 μg/kg, cerca de 70 μg/kg, cerca de 75 μg/kg, cerca de 80 μg/kg, cerca de 85 μg/kg, cerca de 90 μg/kg, cerca de 95 μg/kg, cerca de 100 μg/kg, cerca de 125 μg/kg, cerca de 150 μg/kg, cerca de 175 μg/kg, cerca de 200 μg/kg, cerca de 250 μg/kg, cerca de 300 μg/kg, cerca de 350 μg/kg, cerca de 400 μg/kg, cerca de 450 μg/kg, cerca de 500 μg/kg, cerca de 550 μg/kg, cerca de 600 μg/kg, cerca de 650 μg/kg, cerca de 700 μg/kg, cerca de 750 μg/kg, cerca de 800 μg/kg, cerca de 850 μg/kg, cerca de 900 μg/kg, cerca de 950 μg/kg, cerca de 1.000 μg/kg, cerca de 1050 μg/kg, cerca de 1.100 μg/kg, cerca de 1.150 μg/kg, cerca de 1.200 μg/kg, cerca de 1.250 μg/kg, cerca de 1.300 μg/kg, cerca de 1.350 μg/kg, cerca de 1.400 μg/kg, cerca de 1.450 μg/kg, cerca de 1.500 μg/kg, cerca de 1.550 μg/kg, cerca de 1.600 μg/kg, cerca de 1.650 μg/kg, cerca de 1.700 μg/kg, cerca de 1.750 μg/kg, cerca de 1.800 μg/kg, cerca de 1.850 μg/kg, cerca de 1.900 μg/kg, cerca de 1.950 μg/kg, cerca de 2.000 μg/kg, cerca de 2.500 μg/kg, cerca de 3.000 μg/kg, cerca de 3.500 μg/kg, cerca de 4.000 μg/kg, cerca de 4.500 μg/kg ou cerca de 5.000 μg/kg. Qualquer um destes valores pode ser utilizado para definir uma faixa para a dose do composto. Por exemplo, em algumas modalidades, um composto é administrado a uma dose variando de cerca de 0,5 μg/kg a cerca de 250 μg/kg, 1 μg/kg a cerca de 200 μg/kg, 5 μg/kg a cerca de 150 μg/kg, cerca de 10 μg/kg a cerca de 100 μg/kg, cerca de 10 μg/kg a cerca de 50 μg/kg, cerca de 15 μg/kg a cerca de 35 μg/kg ou cerca de 0,5 μg/kg a cerca de 5.000 μg/kg.

[0128] Os compostos divulgados podem ser administrados em qualquer intervalo desejado. Por exemplo, o composto pode ser administrado uma vez por semana, 2 vezes por semana, 3 vezes por semana, 4 vezes por semana, 5 vezes por semana, 6 vezes por semana, 7 vezes por semana, 8 vezes por semana, 9

vezes por semana ou 10 vezes por semana. O intervalo entre dosagem diária pode ser qualquer intervalo de hora em hora, por exemplo, a cada hora, a cada 2 horas, a cada 3 horas, a cada 4 horas, a cada 5 horas, a cada 6 horas, a cada 7 horas, a cada 8 horas, a cada 9 horas, a cada 10 horas, a cada 11 horas ou a cada 12 horas. O composto pode ser administrado uma vez a cada semana, uma vez a cada 2 semanas, uma vez a cada 3 semanas, uma vez a cada 4 semanas, uma vez a cada 5 semanas, uma vez a cada 6 semanas, uma vez a cada 7 semanas ou uma vez a cada 8 semanas. A administração do composto pode ter esquemas de dosagem irregulares para acomodar a pessoa que administra o composto ou o indivíduo que recebe o composto. Como tal, o composto pode ser administrado, por exemplo, uma vez por dia, duas vezes por dia ou três vezes por dia.

[0129] A quantidade administrada pode ser a mesma quantidade em cada dose ou a dosagem pode variar. Por exemplo, uma primeira quantidade pode ser doseada pela manhã e uma segunda quantidade pode ser administrada pela noite. Um indivíduo pode receber uma primeira dose alta e doses subsequentes baixas. A dose pode ser adjustada para cima ou para baixo dependendo da melhoria nos sintomas ou marcadores da doença, ou desenvolvimento de reações adversas.

[0130] Exemplos não limitativos de carreadores farmaceuticamente aceitáveis incluem solução salina, solução de Ringer e solução de dextrose. Carreadores líquidos podem ser utilizados para preparar soluções, suspensões e emulsões. Um composto descrito na presente invenção pode ser dissolvido ou colocado em suspensão em um portador líquido farmaceuticamente aceitável tal como água, um solvente orgânico, ou uma mistura de ambos, ou óleos ou gorduras farmaceuticamente aceitáveis. O portador líquido pode conter outros aditivos farmacêuticos adequados tais como solubilizadores, emulsificadores, tampões, conservantes, adoçantes, agentes flavorizantes, agentes de suspensão,

agentes espessantes, corantes, reguladores de viscosidade, estabilizadores e osmo-reguladores. Exemplos de carreadores líquidos para administração parenteral incluem água, álcoois (incluindo álcoois mono-hídricos e álcoois poli-hídricos, por exemplo, glicóis) e derivados destes, e óleos (por exemplo, óleo de coco fracionado e óleo de amendoim). Para administração parenteral, o carreador pode ser um éster oleoso tal como oleato de etila ou miristato de isopropila. Carreadores líquidos estéreis são utilizados em composições de forma líquida estéreis para administração parenteral. O pH da solução pode ser de cerca de 5 a cerca de 8, por exemplo, de cerca de 7 a cerca de 7,5.

[0131] Em algumas modalidades, o tratamento com uma molécula da presente invenção é melhor tolerado do que o tratamento com um polipeptídeo de IL-2 de tipo selvagem. Em algumas modalidades, o tratamento com uma dose terapeuticamente eficaz de uma molécula da presente invenção causa menos incidências de em relação ao tratamento com IL2(C125S). Em algumas modalidades, o tratamento com uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma molécula da presente invenção não causa síndrome de vazamento capilar. Em algumas modalidades, o tratamento com uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma molécula da presente invenção não causa diminuição na atividade de neutrófilo ou aumento do risco de infecção.

[0132] Os compostos da presente invenção têm afinidade alta, moderada ou baixa para o receptor de IL-2. Os compostos da presente invenção têm afinidade alta, moderada ou baixa para ST2. Um composto que tem afinidade moderada ou baixa para IL2R e ST2 individualmente pode ter avidez alta quando ambos os receptores estão presentes em uma célula. Um composto da presente invenção tem uma constante de dissociação (Kd) de, por exemplo, de cerca de 1 pmol a cerca de 1 mmol, de cerca de 10 pmol a cerca de 1 mmol, de cerca de 100 pmol a cerca de 1 mmol, de cerca de 1 µmol a cerca de 1 mmol, de cerca de 10

µmol a cerca de 1 mmol, de cerca de 1 µmol a cerca de 100 µmol, de cerca de 1 µmol a cerca de 500 µmol, de cerca de 200 µmol a cerca de 800 µmol, de cerca de 10 µmol a cerca de 100 µmol ou de cerca de 500 µmol a cerca de 1 mmol para se ligar a ST2 ou IL2R individualmente. Um composto da presente invenção pode ter uma Kd evidente mais baixa quando se liga a ST2 e IL-2R, por exemplo, inferior a 95 %, inferior a 90 %, inferior a 85 %, inferior a 80 %, inferior a 75 %, inferior a 70 %, inferior a 65 %, inferior a 60 %, inferior a 55 %, inferior a 50 %, inferior a 45 %, inferior a 40 %, inferior a 35 %, inferior a 30 %, inferior a 25 %, inferior a 20 %, inferior a 15 %, inferior a 10 %, inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3 %, inferior a 2 % ou inferior a 1 % de uma Kd individual.

Farmacocinética

[0133] Uma dose pode ser modulada para obter um perfil farmacocinético (PK) ou farmacodinâmico desejado, tal como um perfil sanguíneo desejado ou eficaz, como descrito na presente invenção.

[0134] Os dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos podem ser obtidos por várias técnicas experimentais. Componentes de perfil farmacocinético e farmacodinâmico apropriados que descrevem uma composição particular podem variar devido às variações no metabolismo de fármaco em indivíduos humanos. Perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos podem ser com base na determinação dos parâmetros médios de um grupo de indivíduos. O grupo de indivíduos inclui qualquer número razoável de indivíduos adequados para determinar uma média representativa, por exemplo, 5 indivíduos, 10 indivíduos, 15 indivíduos, 20 indivíduos, 25 indivíduos, 30 indivíduos, 35 indivíduos ou mais. A média é determinada, por exemplo, calculando-se a média de todas as medições do indivíduo para cada parâmetro medido. Uma dose pode ser modulada para obter um perfil farmacocinético ou farmacodinâmico desejado, tal como um perfil sanguíneo desejado ou eficaz, como aqui descrito.

[0135] Os parâmetros farmacodinâmicos podem ser quaisquer parâmetros adequados para descrever as composições da invenção. Por exemplo, o perfil farmacodinâmico pode ser obtido a um tempo depois de dosagem de, por exemplo, cerca de zero minuto, cerca de 1 minuto, cerca de 2 minutos, cerca de 3 minutos, cerca de 4 minutos, cerca de 5 minutos, cerca de 6 minutos, cerca de 7 minutos, cerca de 8 minutos, cerca de 9 minutos, cerca de 10 minutos, cerca de 11 minutos, cerca de 12 minutos, cerca de 13 minutos, cerca de 14 minutos, cerca de 15 minutos, cerca de 16 minutos, cerca de 17 minutos, cerca de 18 minutos, cerca de 19 minutos, cerca de 20 minutos, cerca de 21 minutos, cerca de 22 minutos, cerca de 23 minutos, cerca de 24 minutos, cerca de 25 minutos, cerca de 26 minutos, cerca de 27 minutos, cerca de 28 minutos, cerca de 29 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 31 minutos, cerca de 32 minutos, cerca de 33 minutos, cerca de 34 minutos, cerca de 35 minutos, cerca de 36 minutos, cerca de 37 minutos, cerca de 38 minutos, cerca de 39 minutos, cerca de 40 minutos, cerca de 41 minutos, cerca de 42 minutos, cerca de 43 minutos, cerca de 44 minutos, cerca de 45 minutos, cerca de 46 minutos, cerca de 47 minutos, cerca de 48 minutos, cerca de 49 minutos, cerca de 50 minutos, cerca de 51 minutos, cerca de 52 minutos, cerca de 53 minutos, cerca de 54 minutos, cerca de 55 minutos, cerca de 56 minutos, cerca de 57 minutos, cerca de 58 minutos, cerca de 59 minutos, cerca de 60 minutos, cerca de zero hora, cerca de 0,5 hora, cerca de 1 hora, cerca de 1,5 hora, cerca de 2 horas, cerca de 2,5 horas, cerca de 3 horas, cerca de 3,5 horas, cerca de 4 horas, cerca de 4,5 horas, cerca de 5 horas, cerca de 5,5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 6,5 horas, cerca de 7 horas, cerca de 7,5 horas, cerca de 8 horas, cerca de 8,5 horas, cerca de 9 horas, cerca de 9,5 horas, cerca de 10 horas, cerca de 10,5 horas, cerca de 11 horas, cerca de 11,5 horas, cerca de 12 horas, cerca de 12,5 horas, cerca de 13 horas, cerca de 13,5 horas, cerca de 14 horas, cerca de 14,5 horas, cerca de 15 horas, cerca de 15,5

horas, cerca de 16 horas, cerca de 16,5 horas, cerca de 17 horas, cerca de 17,5 horas, cerca de 18 horas, cerca de 18,5 horas, cerca de 19 horas, cerca de 19,5 horas, cerca de 20 horas, cerca de 20,5 horas, cerca de 21 horas, cerca de 21,5 horas, cerca de 22 horas, cerca de 22,5 horas, cerca de 23 horas, cerca de 23,5 horas, cerca de 24 horas, cerca de 2 dias, cerca de 3 dias, cerca de 4 dias, cerca de 5 dias, cerca de 6 dias, cerca de 7 dias, cerca de 8 dias, cerca de 9 dias, cerca de 10 dias, cerca de 11 dias, cerca de 12 dias, cerca de 13 dias ou cerca de 14 dias.

[0136] Os parâmetros farmacocinéticos podem ser quaisquer parâmetros adequados para descrever um composto. A C_{max} pode ser, por exemplo, não inferior a cerca de 1 ng/mL; não inferior a cerca de 5 ng/mL; não inferior a cerca de 10 ng/mL; não inferior a cerca de 15 ng/mL; não inferior a cerca de 20 ng/mL; não inferior a cerca de 25 ng/mL; não inferior a cerca de 50 ng/mL; não inferior a cerca de 75 ng/mL; não inferior a cerca de 100 ng/mL; não inferior a cerca de 200 ng/mL; não inferior a cerca de 300 ng/mL; não inferior a cerca de 400 ng/mL; não inferior a cerca de 500 ng/mL; não inferior a cerca de 600 ng/mL; não inferior a cerca de 700 ng/mL; não inferior a cerca de 800 ng/mL; não inferior a cerca de 900 ng/mL; não inferior a cerca de 1.000 ng/mL; não inferior a cerca de 1.250 ng/mL; não inferior a cerca de 1.500 ng/mL; não inferior a cerca de 1.750 ng/mL; não inferior a cerca de 2.000 ng/mL; não inferior a cerca de 2.500 ng/mL; ou qualquer outra C_{max} apropriada para descrever um perfil farmacocinético de um composto aqui descrito. A C_{max} pode ser, por exemplo, cerca de 5 a cerca de 10.000 ng/mL, cerca de 50 a cerca de 10.000 ng/mL, cerca de 500 a cerca de 10.000 ng/mL, cerca de 5.000 a cerca de 10.000 ng/mL, cerca de 1.000 a cerca de 5.000 ng/mL, cerca de 1.000 a cerca de 3.000 ng/mL, cerca de 5.000 a cerca de 8.000 ng/mL ou cerca de 500 a cerca de 1.000 ng/mL no sangue quando administrado por injeção intravenosa, por exemplo, a 50 μg/kg. A C_{max} pode ser,

por exemplo, cerca de 5 a cerca de 50 ng/mL, cerca de 50 a cerca de 500 ng/mL, cerca de 100 a cerca de 250 ng/mL, cerca de 1.000 a cerca de 5.000 ng/mL, cerca de 1.000 a cerca de 2.000 ng/mL, cerca de 2.000 a cerca de 5.000 ng/mL, cerca de 5.000 a cerca de 10.000 ng/mL ou cerca de 5.000 a cerca de 7.000 ng/mL no sangue quando administrado por injeção subcutânea, por exemplo, a 50 µg/kg. A C_{max} pode depender da dose do composto recebido. A dose recebida pode ser 50 µg/kg, 100 µg/kg, 200 µg/kg, 250 µg/kg, 300 µg/kg, 400 µg/kg, 500 µg/kg, 600 µg/kg, 700 µg/kg, 800 µg/kg, 900 µg/kg ou 1.000 µg/kg.

[0137] O T_{max} de um composto descrito na presente invenção pode ser, por exemplo, não superior a cerca de 0,5 hora, não superior a cerca de 1 hora, não superior a cerca de 1,5 hora, não superior a cerca de 2 horas, não superior a cerca de 2,5 horas, não superior a cerca de 3 horas, não superior a cerca de 3,5 horas, não superior a cerca de 4 horas, não superior a cerca de 4,5 horas, não superior a cerca de 5 horas, não superior a cerca de 5,5 horas, não superior a cerca de 6 horas, não superior a cerca de 6,5 horas, não superior a cerca de 7 horas, não superior a cerca de 7,5 horas, não superior a cerca de 8 horas, não superior a cerca de 8,5 horas, não superior a cerca de 9 horas, não superior a cerca de 9,5 horas, não superior a cerca de 10 horas, não superior a cerca de 10,5 horas, não superior a cerca de 11 horas, não superior a cerca de 11,5 horas, não superior a cerca de 12 horas, não superior a cerca de 12,5 horas, não superior a cerca de 13 horas, não superior a cerca de 13,5 horas, não superior a cerca de 14 horas, não superior a cerca de 14,5 horas, não superior a cerca de 15 horas, não superior a cerca de 15,5 horas, não superior a cerca de 16 horas, não superior a cerca de 16,5 horas, não superior a cerca de 17 horas, não superior a cerca de 17,5 horas, não superior a cerca de 18 horas, não superior a cerca de 18,5 horas, não superior a cerca de 19 horas, não superior a cerca de 19,5 horas, não superior a cerca de 20 horas, ou qualquer outro T_{max} apropriado para descrever um perfil

farmacocinético de um composto descrito na presente invenção. O T_{max} pode ser, por exemplo, cerca de 0,1 hora a cerca de 24 horas; cerca de 0,1 hora a cerca de 0,5 hora; cerca de 0,5 hora a cerca de 1 hora; cerca de 1 hora a cerca de 1,5 hora; cerca de 1,5 hora a cerca de 2 hora; cerca de 2 horas a cerca de 2,5 horas; cerca de 2,5 horas a cerca de 3 horas; cerca de 3 horas a cerca de 3,5 horas; cerca de 3,5 horas a cerca de 4 horas; cerca de 4 horas a cerca de 4,5 horas; cerca de 4,5 horas a cerca de 5 horas; cerca de 5 horas a cerca de 5,5 horas; cerca de 5,5 horas a cerca de 6 horas; cerca de 6 horas a cerca de 6,5 horas; cerca de 6,5 horas a cerca de 7 horas; cerca de 7 horas a cerca de 7,5 horas; cerca de 7,5 horas a cerca de 8 horas; cerca de 8 horas a cerca de 8,5 horas; cerca de 8,5 horas a cerca de 9 horas; cerca de 9 horas a cerca de 9,5 horas; cerca de 9,5 horas a cerca de 10 horas; cerca de 10 horas a cerca de 10,5 horas; cerca de 10,5 horas a cerca de 11 horas; cerca de 11 horas a cerca de 11,5 horas; cerca de 11,5 horas a cerca de 12 horas; cerca de 12 horas a cerca de 12,5 horas; cerca de 12,5 horas a cerca de 13 horas; cerca de 13 horas a cerca de 13,5 horas; cerca de 13,5 horas a cerca de 14 horas; cerca de 14 horas a cerca de 14,5 horas; cerca de 14,5 horas a cerca de 15 horas; cerca de 15 horas a cerca de 15,5 horas; cerca de 15,5 horas a cerca de 16 horas; cerca de 16 horas a cerca de 16,5 horas; cerca de 16,5 horas a cerca de 17 horas; cerca de 17 horas a cerca de 17,5 horas; cerca de 17,5 horas a cerca de 18 horas; cerca de 18 horas a cerca de 18,5 horas; cerca de 18,5 horas a cerca de 19 horas; cerca de 19 horas a cerca de 19,5 horas; cerca de 19,5 horas a cerca de 20 horas; cerca de 20 horas a cerca de 20,5 horas; cerca de 20,5 horas a cerca de 21 horas; cerca de 21 horas a cerca de 21,5 horas; cerca de 21,5 horas a cerca de 22 horas; cerca de 22 horas a cerca de 22,5 horas; cerca de 22,5 horas a cerca de 23 horas; cerca de 23 horas a cerca de 23,5 horas; ou cerca de 23,5 horas a cerca de 24 horas.

[0138] A $AUC_{(0\text{-}inf)}$ (também chamada de $AUC_{(0\text{-}\infty)}$) ou $AUC_{(last)}$ de um

composto aqui descrito pode ser, por exemplo, não inferior a cerca de 1 ng•h/mL, não inferior a cerca de 5 ng•h/mL, não inferior a cerca de 10 ng•h/mL, não inferior a cerca de 20 ng•h/mL, não inferior a cerca de 30 ng•h/mL, não inferior a cerca de 40 ng•h/mL, não inferior a cerca de 50 ng•h/mL, não inferior a cerca de 100 ng•h/mL, não inferior a cerca de 150 ng•h/mL, não inferior a cerca de 200 ng•h/mL, não inferior a cerca de 250 ng•h/mL, não inferior a cerca de 300 ng•h/mL, não inferior a cerca de 350 ng•h/mL, não inferior a cerca de 400 ng•h/mL, não inferior a cerca de 450 ng•h/mL, não inferior a cerca de 500 ng•h/mL, não inferior a cerca de 600 ng•h/mL, não inferior a cerca de 700 ng•h/mL, não inferior a cerca de 800 ng•h/mL, não inferior a cerca de 900 ng•h/mL, não inferior a cerca de 1.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 1.250 ng•h/mL, não inferior a cerca de 1.500 ng•h/mL, não inferior a cerca de 1.750 ng•h/mL, não inferior a cerca de 2.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 2.500 ng•h/mL, não inferior a cerca de 3.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 3.500 ng•h/mL, não inferior a cerca de 4.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 5.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 6.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 7.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 8.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 9.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 10.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 11.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 12.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 13.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 14.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 15.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 16.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 17.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 18.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 19.000 ng•h/mL, não inferior a cerca de 20.000 ng•h/mL, ou qualquer outra $AUC_{(0\text{-}inf)}$ apropriada para descrever um perfil farmacocinético de um composto descrito na presente invenção. A $AUC_{(0\text{-}inf)}$ de um composto pode ser, por exemplo, cerca de 1 ng•h/mL a cerca de 10.000 ng•h/mL; cerca de 1 ng•h/mL a cerca de 10 ng•h/mL; cerca de 10 ng•h/mL a cerca de 25 ng•h/mL; cerca de 25 ng•h/mL a

cerca de 50 ng•h/mL; cerca de 50 ng•h/mL a cerca de 100 ng•h/mL; cerca de 100 ng•h/mL a cerca de 200 ng•h/mL; cerca de 200 ng•h/mL a cerca de 300 ng•h/mL; cerca de 300 ng•h/mL a cerca de 400 ng•h/mL; cerca de 400 ng•h/mL a cerca de 500 ng•h/mL; cerca de 500 ng•h/mL a cerca de 600 ng•h/mL; cerca de 600 ng•h/mL a cerca de 700 ng•h/mL; cerca de 700 ng•h/mL a cerca de 800 ng•h/mL; cerca de 800 ng•h/mL a cerca de 900 ng•h/mL; cerca de 900 ng•h/mL a cerca de 1.000 ng•h/mL; cerca de 1.000 ng•h/mL a cerca de 1.250 ng•h/mL; cerca de 1.250 ng•h/mL a cerca de 1.500 ng•h/mL; cerca de 1.500 ng•h/mL a cerca de 1.750 ng•h/mL; cerca de 1.750 ng•h/mL a cerca de 2.000 ng•h/mL; cerca de 2.000 ng•h/mL a cerca de 2.500 ng•h/mL; cerca de 2.500 ng•h/mL a cerca de 3.000 ng•h/mL; cerca de 3.000 ng•h/mL a cerca de 3.500 ng•h/mL; cerca de 3.500 ng•h/mL a cerca de 4.000 ng•h/mL; cerca de 4.000 ng•h/mL a cerca de 4.500 ng•h/mL; cerca de 4.500 ng•h/mL a cerca de 5.000 ng•h/mL; cerca de 5.000 ng•h/mL a cerca de 5.500 ng•h/mL; cerca de 5.500 ng•h/mL a cerca de 6.000 ng•h/mL; cerca de 6.000 ng•h/mL a cerca de 6.500 ng•h/mL; cerca de 6.500 ng•h/mL a cerca de 7.000 ng•h/mL; cerca de 7.000 ng•h/mL a cerca de 7.500 ng•h/mL; cerca de 7.500 ng•h/mL a cerca de 8.000 ng•h/mL; cerca de 8.000 ng•h/mL a cerca de 8.500 ng•h/mL; cerca de 8.500 ng•h/mL a cerca de 9.000 ng•h/mL; cerca de 9.000 ng•h/mL a cerca de 9.500 ng•h/mL; cerca de 9.500 ng•h/mL a cerca de 10.000 ng•h/mL; cerca de 10.000 ng•h/mL a cerca de 10.500 ng•h/mL; cerca de 10.500 ng•h/mL a cerca de 11.000 ng•h/mL; cerca de 11.000 ng•h/mL a cerca de 11.500 ng•h/mL; cerca de 11.500 ng•h/mL a cerca de 12.000 ng•h/mL; cerca de 12.000 ng•h/mL a cerca de 12.500 ng•h/mL; cerca de 12.500 ng•h/mL a cerca de 13.000 ng•h/mL; cerca de 13.000 ng•h/mL a cerca de 13.500 ng•h/mL; cerca de 13.500 ng•h/mL a cerca de 14.000 ng•h/mL; cerca de 14.000 ng•h/mL a cerca de 14.500 ng•h/mL; cerca de 14.500 ng•h/mL a cerca de 15.000 ng•h/mL; cerca de 15.000 ng•h/mL a cerca de 15.500

ng•h/mL; cerca de 15.500 ng•h/mL a cerca de 16.000 ng•h/mL; cerca de 16.000 ng•h/mL a cerca de 16.500 ng•h/mL; cerca de 16.500 ng•h/mL a cerca de 17.000 ng•h/mL; cerca de 17.000 ng•h/mL a cerca de 17.500 ng•h/mL; cerca de 17.500 ng•h/mL a cerca de 18.000 ng•h/mL; cerca de 18.000 ng•h/mL a cerca de 18.500 ng•h/mL; cerca de 18.500 ng•h/mL a cerca de 19.000 ng•h/mL; cerca de 19.000 ng•h/mL a cerca de 19.500 ng•h/mL; ou cerca de 19.500 ng•h/mL a cerca de 20.000 ng•h/mL. Por exemplo, a $AUC_{(0\text{-}inf)}$ de um composto pode ser cerca de 8.500 ng•h/mL quando administrado intravenosamente a 50 µg/kg ou cerca de 4.000 ng•h/mL quando administrado subcutaneamente a 50 µg/kg.

[0139] A concentração plasmática de um composto descrito na presente invenção pode ser, por exemplo, não inferior a cerca de 1 ng/mL, não inferior a cerca de 5 ng/mL, não inferior a cerca de 10 ng/mL, não inferior a cerca de 15 ng/mL, não inferior a cerca de 20 ng/mL, não inferior a cerca de 25 ng/mL, não inferior a cerca de 50 ng/mL, não inferior a cerca de 75 ng/mL, não inferior a cerca de 100 ng/mL, não inferior a cerca de 150 ng/mL, não inferior a cerca de 200 ng/mL, não inferior a cerca de 300 ng/mL, não inferior a cerca de 400 ng/mL, não inferior a cerca de 500 ng/mL, não inferior a cerca de 600 ng/mL, não inferior a cerca de 700 ng/mL, não inferior a cerca de 800 ng/mL, não inferior a cerca de 900 ng/mL, não inferior a cerca de 1.000 ng/mL, não inferior a cerca de 1200 ng/mL, ou qualquer outra concentração plasmática de um composto aqui descrito. A concentração plasmática pode ser, por exemplo, cerca de 1 ng/mL a cerca de 2.000 ng/mL; cerca de 1 ng/mL a cerca de 5 ng/mL; cerca de 5 ng/mL a cerca de 10 ng/mL; cerca de 10 ng/mL a cerca de 25 ng/mL; cerca de 25 ng/mL a cerca de 50 ng/mL; cerca de 50 ng/mL a cerca de 75 ng/mL; cerca de 75 ng/mL a cerca de 100 ng/mL; cerca de 100 ng/mL a cerca de 150 ng/mL; cerca de 150 ng/mL a cerca de 200 ng/mL; cerca de 200 ng/mL a cerca de 250 ng/mL; cerca de 250 ng/mL a cerca de 300 ng/mL; cerca de 300 ng/mL a cerca de 350 ng/mL;

cerca de 350 ng/mL a cerca de 400 ng/mL; cerca de 400 ng/mL a cerca de 450 ng/mL; cerca de 450 ng/mL a cerca de 500 ng/mL; cerca de 500 ng/mL a cerca de 600 ng/mL; cerca de 600 ng/mL a cerca de 700 ng/mL; cerca de 700 ng/mL a cerca de 800 ng/mL; cerca de 800 ng/mL a cerca de 900 ng/mL; cerca de 900 ng/mL a cerca de 1.000 ng/mL; cerca de 1.000 ng/mL a cerca de 1.100 ng/mL; cerca de 1.100 ng/mL a cerca de 1.200 ng/mL; cerca de 1.200 ng/mL a cerca de 1.300 ng/mL; cerca de 1.300 ng/mL a cerca de 1.400 ng/mL; cerca de 1.400 ng/mL a cerca de 1.500 ng/mL; cerca de 1.500 ng/mL a cerca de 1.600 ng/mL; cerca de 1.600 ng/mL a cerca de 1.700 ng/mL; cerca de 1.700 ng/mL a cerca de 1.800 ng/mL; cerca de 1.800 ng/mL a cerca de 1.900 ng/mL; ou cerca de 1.900 ng/mL a cerca de 2.000 ng/mL.

[0140] Os parâmetros farmacodinâmicos podem ser quaisquer parâmetros adequados para descrever composições da invenção. Por exemplo, o perfil farmacodinâmico pode exibir contagens de célula Treg aumentadas para, por exemplo, cerca de 24 horas, cerca de 48 horas, cerca de 72 horas ou 1 semana.

[0141] Exemplos não limitativos de parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos que podem ser calculados para um composto que é administrado com os métodos da invenção incluem: a) a quantidade de fármaco administrado, que pode ser representado como uma dose *D*; b) o intervalo de dosagem, que pode ser representado como τ; c) o volume aparente em que um fármaco é distribuído, que pode ser representado como um volume de distribuição V_d, onde $V_d = D/C_0$; d) a quantidade de fármaco em um dado volume de plasma, que pode ser representado como concentração C_0 ou C_{ss}, onde C_0 ou C_{ss} = D/V*d* e pode ser representado como uma concentração plasmática média sobre uma pluralidade de amostras; e) a meia-vida de um fármaco $t_{1/2,}$ onde $t_{1/2} = ln(2)/k_e$; f) a taxa na qual um fármaco é removido do corpo k_e, onde $k_e = ln(2)/t_{1/2} = CL/V_d$; g) a taxa de infusão necessária para equilibrar a equação K_{in},

onde K_{in} = $C_{ss}.CL$; h) a integral da curva de concentração-tempo depois da administração de uma dose única, que pode ser representada como $AUC_{0-\infty}$, em que $\int_0^{\infty} C\ dt$, ou no estado estacionário, que pode ser representado como $AUC_{\tau,ss}$, em que $\int_t^{t+\pi} C\ dt$; i) o volume de plasma limpo do fármaco por unidade de tempo, que pode ser representado como CL (liberação), em que $CL = V_d.k_e = D/AUC$; j) a fração sistemicamente disponível de um fármaco, que pode ser representado como ƒ, onde ƒ = $\frac{AUCpo.Div}{AUCiv.Dpo}$; k) a concentração plasmática máxima de um fármaco depois da administração C_{max}; l) o tempo gasto por um fármaco para atingir C_{max}, T_{max}; m) a concentração mais baixa que um fármaco atinge antes que a próxima dose é administrada C_{min}; e n) a flutuação máxima dentro de um intervalo de dosagem no estado estacionário, que pode ser representada como $\%PTF = 100.\ \frac{(Cmax,ss-Cmin,ss)}{Cav,ss}$ onde $C_{av,ss} = \frac{AUC\tau,ss}{\tau}$.

[0142] Os compostos da presente invenção podem ter estabilidade alta quando administrado a um indivíduo. O composto administrado pode ter uma meia-vida fisiológica superior a cerca de 6 h, superior a cerca de 7 h, superior a cerca de 8 h, superior a cerca de 9 h, superior a cerca de 10 h, superior a cerca de 11 h, superior a cerca de 12 h, superior a cerca de 13 h, superior a cerca de 14 h, superior a cerca de 15 h, superior a cerca de 16 h, superior a cerca de 17 h, superior a cerca de 18 h, superior a cerca de 19 h, superior a cerca de 20 h, superior a cerca de 21 h, superior a cerca de 22 h, superior a cerca de 23 h, superior a cerca de 24 h, superior a cerca de 25 h, superior a cerca de 26 h, superior a cerca de 27 h, superior a cerca de 28 h, superior a cerca de 29 h, superior a cerca de 30 h, superior a cerca de 31 h, superior a cerca de 32 h, superior a cerca de 33 h, superior a cerca de 34 h, superior a cerca de 35 h, superior a cerca de 36 h, superior a cerca de 37 h, superior a cerca de 38 h, superior a cerca de 39 h, superior a cerca de 40 h, superior a cerca de 41 h,

superior a cerca de 42 h, superior a cerca de 43 h, superior a cerca de 44 h, superior a cerca de 45 h, superior a cerca de 46 h, superior a cerca de 47 h, superior a cerca de 48 h, superior a cerca de 49 h, superior a cerca de 50 h, superior a cerca de 51 h, superior a cerca de 52 h, superior a cerca de 53 h, superior a cerca de 54 h, superior a cerca de 55 h, superior a cerca de 56 h, superior a cerca de 57 h, superior a cerca de 58 h, superior a cerca de 59 h, superior a cerca de 60 h, superior a cerca de 61 h, superior a cerca de 62 h, superior a cerca de 63 h ou superior a cerca de 64 h.

[0143] A meia-vida de um composto da presente invenção pode variar com base na dose administrada. Por exemplo, a meia-vida do composto quando administrado em uma dose de 50 μg/kg pode ser mais curta do que meia-vida do mesmo composto quando administrado a uma dose de 100 μg/kg ou 250 μg/kg. A meia-vida do composto pode variar com base na via de administração utilizada. A meia-vida do composto pode ser mais longa se o composto for administrado subcutaneamente em vez de intravenosamente. Por exemplo, a meia-vida de um composto liberado subcutaneamente pode ser entre cerca de 15 h e cerca de 25 h, enquanto que a meia-vida do composto liberado intravenosamente pode ser entre cerca de 5 e cerca de 15 h. Em algumas modalidades, a meia-vida de um composto quando administrado intravenosamente a 50 μg/kg é de cerca de 6 h a cerca de 14 h, cerca de 7 h a cerca de 13 horas, cerca de 8 h a cerca de 12 h ou cerca de 9 h a cerca de 11 h. Em algumas modalidades, a meia-vida de um composto quando administrado intravenosamente a 50 μg/kg é de cerca de 5 h, cerca de 6 h, cerca de 7 h, cerca de 8 h, cerca de 9 h, cerca de 10 h, cerca de 11 h, cerca de 12 h, cerca de 13 h, cerca de 14 h ou cerca de 15 h. Em algumas modalidades, a meia-vida de um composto quando administrado subcutaneamente a 50 μg/kg é de cerca de 15 h a cerca de 27 h, cerca de 16 h a cerca de 26 horas, cerca de 17 h a cerca de 25 h,

cerca de 18 h a cerca de 24 h, cerca de 19 h a cerca de 23 h ou cerca de 20 h a cerca de 22 h. Em algumas modalidades, a meia-vida de um composto quando administrado subcutaneamente a 50 μg/kg é de cerca de 10 h, cerca de 11 h, cerca de 12 h, cerca de 13 h, cerca de 14 h, cerca de 15 h, cerca de 16 h, cerca de 17 h, cerca de 18 h, cerca de 19 h, cerca de 21 h, cerca de 22 h, cerca de 23 h, cerca de 24 h, cerca de 25 h, cerca de 26 h, cerca de 27 h, cerca de 28 h, cerca de 29 h ou cerca de 30 h. A liberação do composto a partir do sangue pode ser mais rápida para um composto liberado intravenosamente do que para um composto liberado subcutaneamente.

Produção de Proteínas Diméricas: Heterodímeros e Homodímeros

[0144] Em algumas modalidades, um composto da presente invenção é um heterodímero, por exemplo, um heterodímero compreendendo uma porção de ligação a IL2R (por exemplo, IL-2 ou uma variante de IL-2) que é parte de uma primeira proteína de fusão e uma porção de ligação a ST2 (por exemplo, IL-33, uma variante de IL-33, um anticorpo que se liga a ST2 ou um fragmento de ligação ao antígeno deste) que é parte de uma segunda proteína de fusão. Em algumas modalidades, cada um da primeira e segunda proteínas de fusão compreende um domínio Fc de IgG, por exemplo um domínio Fc de IgG1 ou variante do mesmo. Os heterodímeros podem ser produzidos expressando-se as duas proteínas recombinantes constituintes individualmente, purificando-as e combinando-as *in vitro* para formar heterodímeros ligados a dissulfeto. As proteínas de fusão Fc heterodiméricas também podem ser feitas em uma célula única transfectada com dois construtos de cDNA constituintes utilizando o método "*knobs into holes*". Por esta estratégia, as mutações são introduzidas na interface de CH2-CH3 entre as duas cadeias de polipeptídeo Fc que evitam a formação de homodímeros, ainda formam interfaces complementares que promovem a formação de heterodímeros. Desta maneira, as proteínas de fusão

Fc heterodiméricas podem ser formadas dentro das células hospedeiras que expressam as proteínas recombinantes e secretadas como proteínas heterodiméricas. Abaixo são dois exemplos de construtos Fc em um fundo de IgG1 humana. Os resíduos T366Y e Y407T mutados são mostrados em negrito e sublinhados, e o resíduo N297A está sublinhado.

[0145] (A) Fc de IgG1 (N297A; T366Y): DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL**Y**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 8)

[0146] (B) Fc de IgG1 (N297A; Y407T): DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFL**T**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 9)

[0147] As duas diferentes porções de ligação, por exemplo, IL-2 e IL-33, podem ser anexadas às sequências Fc (A) e (B), respectivamente, para construir uma proteína heterodimérica.

[0148] Em algumas modalidades, a primeira proteína de fusão compreende um domínio Fc de IgG1 compreendendo as mutações T350V, L351Y, F405A e Y407V (por exemplo, SEQ ID NO: 4); e a segunda proteína de fusão compreende as mutações T350V, T366L, K392L e T394W (por exemplo, SEQ ID NO: 5). Tais mutações foram relatadas melhorar emparelhamento e estabilidade apropriados (Von Kreudenstein *et al.*, 2013, mAbs 5: 646 - 654; WO 2014082179 A1). Sequências de domínio Fc de IgG1 humana exemplares são mostradas abaixo com a mutação N297A sublinhada, e as mutações T350V, L351Y, F405A, Y407V, T350V, T366L, K392L e T394W mostradas em negrito e sublinhadas.

[0149] (A) Fc de IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A e Y407V) DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVY**VY**PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSF**A**L**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 4)

[0150] (B) Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L e T394W) DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVY**V**LPPSRDELTKNQVSL**L**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY**L**T**W**PPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5)

[0151] Os heterodímeros exemplares são mostrados nas Figuras 4A, 4B, 4C, 4D e 4E.

[0152] Em algumas modalidades, um composto da presente invenção é um homodímero, por exemplo, um homodímero compreendendo duas proteínas de fusão idênticas, cada uma contendo uma porção de ligação a IL2R (por exemplo, IL-2 ou uma variante de IL-2) e uma porção de ligação a ST2 (por exemplo, IL-33, uma variante de IL-33, um anticorpo que se liga a ST2 ou um fragmento de ligação ao antígeno deste). Em algumas modalidades, cada uma das duas proteínas de fusão idênticas compreende um domínio Fc de IgG, por exemplo, um domínio Fc de IgG1 ou variante deste. Em uma modalidade particular, o domínio Fc de IgG1 é um domínio Fc de IgG1 humana compreendendo a mutação N297A (por exemplo, SEQ ID NO: 7). Homodímeros exemplares são mostrados nas Figuras 1F e 1G.

[0153] A porção de ligação a IL2R (por exemplo, IL-2 ou uma variante de IL-2) e a porção de ligação a ST2 (por exemplo, IL-33, uma variante de IL-33, um anticorpo que se liga a ST2 ou um fragmento de ligação ao antígeno deste) pode ser ligado ao N-terminal ou ao C-terminal do domínio Fc de IgG, diretamente ou

através de um peptídeo ligante (por exemplo, um ligante de G_4S). Várias combinações de uma porção de ligação a IL2R e de uma porção de ligação a ST2 podem ser utilizadas. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma primeira proteína de fusão compreendendo uma porção de ligação a IL2R N-terminal para o domínio Fc de IgG, e uma segunda proteína de fusão compreendendo uma porção de ligação a ST2 C-terminal para o domínio Fc de IgG (ver, por exemplo, Figura 4A). Em algumas modalidades, a primeira proteína de fusão compreende uma porção de ligação a IL2R N-terminal para o domínio Fc de IgG, e a segunda proteína de fusão compreende uma porção de ligação a ST2 N-terminal para o domínio Fc de IgG (ver, por exemplo, Figuras 4B e 5D). Em algumas modalidades, a primeira proteína de fusão compreende uma porção de ligação a IL2R C-terminal para o domínio Fc de IgG, e a segunda proteína de fusão compreende uma porção de ligação a ST2 N-terminal para o domínio Fc de IgG (ver, por exemplo, Figuras 4C e 5C). Em algumas modalidades, a primeira proteína de fusão compreende uma porção de ligação a IL2R C-terminal para o domínio Fc de IgG, e a segunda proteína de fusão compreende uma porção de ligação a ST2 C-terminal para o domínio Fc de IgG. Em algumas modalidades, a primeira proteína de fusão compreende uma porção de ligação a ST2 N-terminal para o domínio Fc de IgG e uma porção de ligação a IL2R C-terminal para o domínio Fc de IgG, e a segunda proteína de fusão compreende uma porção de ligação a ST2 N-terminal para o domínio Fc de IgG (ver, por exemplo, Figura 4D e 5B). Em algumas modalidades, a primeira proteína de fusão compreende uma porção de ligação a ST2 N-terminal para o domínio Fc de IgG e uma porção de ligação a IL2R C-terminal para o domínio Fc de IgG, e a segunda proteína de fusão compreende uma porção de ligação a IL2R N-terminal para o domínio Fc de IgG (ver, por exemplo, Figura 4E). Em algumas modalidades, tanto a primeira proteína de fusão quanto a segunda proteína de fusão compreende

uma porção de ligação a ST2 N-terminal para o domínio Fc de IgG e uma porção de ligação a IL2R C-terminal para o domínio Fc de IgG (ver, por exemplo, Figura 4F e Figura 5A). Em algumas modalidades, tanto a primeira proteína de fusão quanto a segunda proteína de fusão compreende uma porção de ligação a IL2R N-terminal para o domínio Fc de IgG e uma porção de ligação a ST2 C-terminal para o domínio Fc de IgG (ver, por exemplo, Figura 4G). Em algumas modalidades, a primeira proteína de fusão compreende uma porção de ligação a IL2R C-terminal para o domínio Fc de IgG, e a segunda proteína de fusão compreende uma porção de ligação a ST2 N-terminal para o domínio Fc de IgG e uma porção de ligação a IL2R C-terminal para o domínio Fc de IgG (ver, por exemplo, Figura 5E).

[0154] Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende pelo menos uma porção de ligação a IL2R (por exemplo, IL-2 ou uma variante de IL-2) e pelo menos uma porção de ligação a ST2 (por exemplo, IL-33, uma variante de IL-33, um anticorpo que se liga a ST2 ou um fragmento de ligação ao antígeno deste). Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende apenas uma porção de ligação a IL2R. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende apenas uma porção de ligação a ST2.

[0155] Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende pelo menos duas porções de ligação a IL2R. Por exemplo, em algumas modalidades, a primeira e a segundo proteínas de fusão contêm pelo menos uma porção de ligação a IL2R. Ver, por exemplo, as Figuras 4E, 4F e 4G. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende pelo menos duas porções de ligação a ST2. Por exemplo, em algumas modalidades, a primeira e a segunda proteínas de fusão contêm pelo menos uma porção de ligação a ST2. Ver, por exemplo, as Figuras 4D, 4F e 4G.

[0156] Em qualquer uma das modalidades descritas na presente invenção,

a porção de ligação a IL2R e a porção de ligação a ST2 podem ser ligadas ao domínio Fc de IgG através de um peptídeo ligante (por exemplo, um ligante de G_4S). A proteína dimérica pode conter, 1, 2, 3, 4 ou mais ligantes peptídicos. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende pelo menos 1, 2, 3 ou 4 ligantes peptídicos.

[0157] Em algumas modalidades, a porção de ligação a IL2R e/ou a porção de ligação a ST2 é fundida diretamente para o domínio Fc de IgG através de uma ligação peptídica, isto é, sem a adição de um peptídeo ligante entre a porção de ligação e o domínio Fc de IgG. Em alguma modalidade, a proteína dimérica não compreende um peptídeo ligante.

[0158] Em algumas modalidades, a primeira proteína de fusão da proteína dimérica é configurada de modo que o C-terminal da porção de ligação a IL-2 (por exemplo, um domínio proteico de IL-2 humana ou uma variante deste) seja fundido através de uma ligação peptídica ao N-terminal de um primeiro domínio de peptídeo ligante; e o N-terminal do primeiro domínio proteico Fc de IgG seja fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do primeiro domínio de peptídeo ligante. Em algumas modalidades, a segunda proteína de fusão da proteína dimérica é configurada de modo que o C-terminal de um segundo domínio proteico Fc de IgG seja fundido através de uma ligação peptídica ao N-terminal de um segundo domínio de peptídeo ligante; e o N-terminal de um domínio proteico que se liga ao ST2 seja fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do segundo domínio de peptídeo ligante. Ver, por exemplo, a Figura 4A. Em algumas modalidades, a segunda proteína de fusão da proteína dimérica é configurada de modo que o C-terminal da porção de ligação a ST2 seja fundido através de uma ligação peptídica ao N-terminal de um segundo domínio de peptídeo ligante; e o N-terminal do segundo domínio proteico Fc de IgG seja fundido através de uma ligação peptídica ao C-terminal do segundo domínio de

peptídeo ligante. Ver, por exemplo, a Figura 4B.

[0159] Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, a proteína dimérica

compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo

menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. Em algumas modalidades, a proteína dimérica compreende uma proteína de fusão tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

Descrição das Sequências nas Listagens de Sequência

SEQ ID NO:	Descrição
1	IL-2 humana compreendendo as mutações N88R e C125S
2	IL-2 humana de tipo selvagem
3	IL-2 humana compreendendo as mutações T3A, N88R e C125S
4	Fc de IgG1 humana (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)
5	Fc de IgG1 humana (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)
6	Peptídeo ligante GGGGSGGGGSGGGGS $(G4S)_3$
7	Porção Fc de IgG1 humana (N297A)
8	Fc de IgG1 humana (T366Y)

9	Fc de IgG1 humana (Y407T)
10	Resíduos 112-170 de IL-33 humana de tipo selvagem
11	Resíduos 112-170 de IL-33 humana compreendendo as mutações C208S, C227S, C232S e C259S
12	IL-2 (N88R, C125)/ligante $(G4S)_3$/proteína de fusão Fc de IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V) Fig. 4A
13	Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/ligante $(G4S)_3$/proteína de fusão de IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S) Fig. 4A
14	IL-2 (N88R, C125)/ligante $(G4S)_3$/proteína de fusão Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W) Fig. 4B
15	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/proteína de fusão Fc de IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V) Fig. 4B
16	Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/ligante $(G4S)_3$/proteína de fusão de IL-2 (N88R, C125) Fig. 4C
17	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/ligante $(G4S)_3$/proteína de fusão IL-2 (N88R, C125) Fig. 4D
18	IL-2 (N88R, C125)/ligante $(G4S)_3$/ligante Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)$(G4S)_3$/proteína de fusão de IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)

	Fig. 4E
19	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A)/ligante $(G4S)_3$/proteína de fusão de IL-2 (N88R, C125) Fig. 4F
20	Proteína de fusão de IL-2 (N88R, C125)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A)/ligante $(G4S)_3$/proteína de fusão de IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S) Fig. 4G
21	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/proteína de fusão Fc de IgG1 (N297A) Fig. 4J
22	Ab2PesadaIL2vC
23	Ab4PesadaIL2vC
24	Ab2PesadaIL2vC(W)
25	Ab4PesadaIL2vC(W)
26	Ab2Pesada(V)
27	Ab4Pesada(V)
28	IL2vCFc(V)
29	Ab2Kappa
30	Ab4Kappa
31	Peptídeo ligante GGGGS

EXEMPLOS

Exemplo 1. Construção de Moléculas Biespecíficas de Alvejamento de ST2 e IL2R

[0160] As moléculas biespecíficas que alvejam ST2 (receptor de IL-33) e receptor de alta afinidade de IL-2 foram construídas. Todas as moléculas

construídas são listadas nas Tabelas 1 e 2 abaixo. Seus diagramas esquemáticos são mostrados nas Figuras 4 e 5.

[0161] As moléculas biespecíficas na Tabela 1 e Figura 4 são proteínas de fusão Fc, compreendidas de porções de alvejamento ao receptor que são um agonista do receptor de alta afinidade de IL-2 (isto é, uma variante de IL-2) e uma variante de IL-33. Cada molécula contém porções de alvejamento ao receptor monovalentes ou bivalentes no N- ou C-terminal. Um peptídeo ligante, $(G4S)_3$ conecta o domínio Fc de IgG1 humana e as porções de alvejamento ao receptor. O domínio Fc contém a substituição N297A para FcgR reduzido e ligação a C1q e assim reduzir as funções efetoras Fc. A porção IL-33 compreende o fragmento Ser112-Thr270 de IL-33 humana, que é uma forma bioativa da proteína IL-33. Além disso, a porção IL-33 contém as substituições C208S, C227S, C232S e C259S. As substituições de cisteína para serina foram relatadas evitar a inativação de IL-33 por oxidação (Cohen *et al.*, 2015, Nature Commun 6: 8327; WO2016/156440). Esta variante foi selecionada para facilitar a produção de variante de IL-33 ativa contendo proteínas nas células HEK293. O receptor de agonista de IL-2 é uma variante de IL-2 humana de 133 aminoácidos contendo as substituições N88R e C125S em relação à sequência de IL-2 humana de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2).

[0162] As moléculas biespecíficas na Tabela 2 e Figura 5 são compreendidas da variante de IL-2 humana (N88R, C125S) e um fragmento de ligação ao antígeno (Fab) de um anticorpo anti-ST2. Como uma prova de conceito, dois mAbs anti-ST2, Ab2 e Ab4, foram selecionados de um pedido de patente publicado (US2017/0002079 A1). Cada molécula bispecífica é monovalente ou bivalente em relação ao fragmento de ligação anti-ST2 com o antígeno e é covalentemente conectada ao receptor de agonista de IL-2 no N- ou C-terminal através do peptídeo ligante, $(G4S)_3$.

[0163] A produção de proteínas Fc heterodiméricas pode ser desafiadora

devido à potencial contaminação por homodímeros. Todas as moléculas heterodiméricas neste exemplo têm mutações no domínio Fc para reduzir o emparelhamento de homodímero indesejado. As mutações incluem T350V, L351Y, F405A & Y407V em uma cadeia; e T350V, T366L, K392L & T394W na outra cadeia. Tais mutações foram relatadas melhorar o emparelhamento e estabilidade apropriados (Von Kreudenstein *et al.*, 2013, mAbs 5: 646 - 654; WO 2014082179 A1).

Tabela 1. Proteínas diméricas compreendendo regiões Fc de IgG1 humana e uma variante de IL-33 humana (C208S, C227S, C232S, C259S), ou combinações de uma variante de IL-2 humana (N88R, C125S) e a variante de IL-33 humana. Diagramas das proteínas são fornecidos na Figura 4A-4J. Nos nomes de proteína dimérica, “N” indica uma fusão de N-terminal para o domínio Fc, “C” indica uma fusão de C-terminal, “M” indica monovalente, “B” indica bivalente e “v” indica variante.

Proteína Dimérica (Figura)	Proteínas de Fusão	SEQ ID NO:
IL2vNM-IL33vCM (4A)	IL-2 (N88R, C125)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	12
	Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/ligante $(G4S)_3$/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	13
IL2vNM-IL33vNM (4B)	IL-2 (N88R, C125)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)	14
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL33vNM-IL2vCM	Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L,	16

(4C)	T394W)/ligante $(G4S)_3$/IL-2 (N88R, C125)	
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL33vNB-IL2vCM (4D)	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/ligante $(G4S)_3$/IL-2 (N88R, C125)	17
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL2vNB-IL33vCM (4E)	IL-2 (N88R, C125)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)$(G4S)_3$ ligante/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	18
	IL-2 (N88R, C125)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	12
IL33vNB-IL2vCB (4F)	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A)/ligante $(G4S)_3$/IL-2 (N88R, C125)	19
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A)/ligante $(G4S)_3$/IL-2 (N88R, C125)	19
IL2vNB-IL33vCB (4G)	IL-2 (N88R, C125)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A)/ligante $(G4S)_3$/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	20
	IL-2 (N88R, C125)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A)/ligante $(G4S)_3$/IL-33 (C208S, C227S,	20

	C232S, C259S)	
IL33vNM (4 H)	Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)	5
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL33vCM (4I)	Fc de IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/ligante $(G4S)_3$/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	13
	Fc de IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	4
IL33vNB (4J)	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A)	21
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/ligante $(G4S)_3$/Fc de IgG1 (N297A)	21

Tabela 2. Proteínas diméricas compreendendo regiões Fc, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo anti-ST2 e uma variante de IL-2 (N88R, C125S). Diagramas das proteínas são fornecidos nas Figuras 5A a 5E.

FIG.	Proteína Dimérica	Cadeia Pesada 1 (Proteína de Fusão)	Cadeia Pesada 2 (Proteína de Fusão)	Cadeias Leves
5A	Ab2-IL2vCB	Ab2Pesada-IL2vC (SEQ ID NO: 22)	(mesmo como Cadeia Pesada 1, homodímero)	Ab2Kappa (SEQ ID NO: 29)
	Ab4-IL2vCB	Ab4Pesada-	(mesmo como	Ab4Kappa

		IL2vC (SEQ ID NO: 23)	Cadeia Pesada 1, homodímero)	(SEQ ID NO: 30)
5B	Ab2-IL2vCM	Ab2Pesada(V) (SEQ ID NO: 26)	Ab2PesadaIL2vC(W) (SEQ ID NO: 24)	Ab2Kappa (SEQ ID NO: 29)
	Ab4-IL2vCM	Ab4Pesada(V) (SEQ ID NO: 27)	Ab4PesadaIL2vC(W) (SEQ ID NO: 25)	Ab4Kappa (SEQ ID NO: 30)
5C	Ab2M-IL2vCM	Ab2Pesada(V) (SEQ ID NO: 26)	IL2vCFc(W) (SEQ ID NO: 16)	Ab2Kappa (SEQ ID NO: 29)
	AB4M-IL2vCM	Ab4Pesada(V) (SEQ ID NO: 27)	IL2vCFc(W) (SEQ ID NO: 16)	Ab4Kappa (SEQ ID NO: 30)
5D	Ab2M-IL2vNM	Ab2Pesada(V) (SEQ ID NO: 26)	IL2vNFc(W) (SEQ ID NO: 14)	Ab2Kappa (SEQ ID NO: 29)
	Ab4M-IL2vNM	Ab4Pesada(V) (SEQ ID NO: 27)	IL2vNFc(W) (SEQ ID NO: 14)	Ab4Kappa (SEQ ID NO: 30)
5E	Ab2M-IL2vCB	IL2vCFc(V) (SEQ ID NO: 28)	Ab2PesadaIL2vC(W) (SEQ ID NO: 24)	Ab2Kappa (SEQ ID NO: 29)
	Ab4M-IL2vCB	IL2vCFc(V) (SEQ ID NO: 28)	Ab4PesadaIL2C(W) (SEQ ID NO: 25)	Ab4Kappa (SEQ ID NO: 30)

[0164] Todas as moléculas foram produzidas nas células HEK293 transientemente transfectadas e purificadas por cromatografia de afinidade de Proteína A seguida por cromatografia por exclusão de tamanho. Devido aos níveis de expressão de proteínas significativamente reduzidos em relação a IL2vNM-IL33vCM (Fig. 4A), as seguintes moléculas não foram incluídas na caracterização de ligação: IL33vNM-IL2vCM (Fig. 4C), IL33vNB-IL2vCM (Fig. 4D), IL2vNB-IL33vCM (Fig. 4E), IL33vNB-IL2vCB (Fig. 4F) e IL2vNB-IL33vCB (Fig. 4G).

Exemplo 2. Caracterização de ligação de moléculas biespecíficas de IL33-IL2v

[0165] A ligação das proteínas biespecíficas aos domínios extracelulares (ECD) de ST2 (Sino Biological) e IL2Ra (Lake Pharma, Inc.) foi avaliada por ressonância plasmônica de superfície (SPR) utilizando o instrumento Biacore T200 (GE). O anticorpo anti-His Tag (GenScript) foi imobilizado em chips CM4 (GE) por acoplamento de NHS-EDS, e as reações de ligação foram realizadas em tampão HBS-EP+ (GE) a 25 °C. Proteína ECD de ST2 etiquetada com His foi capturada por chips revestidos de anticorpo anti-His Tag.

[0166] Para a ligação de ST2, a proteína ECD de ST2 de camundongo ou humano etiquetada com histidina foi capturada no chip como ligantes. As moléculas biespecíficas foram injetadas como analitos a uma taxa de fluxo de 50 µl/min por 60 s e deixadas dissociar por 200 s para ST2 humano e 120 s pata ST2 de camundongo. As moléculas biespecíficas foram preparadas em várias concentrações (0,12 nM a 10 nM por diluição de 3 vezes para interação de ST2 humano; e 2,5 nM a 200 nM por diluição de 3 vezes para interação de ST2 de camundongo). A superfície do chip foi regenerada com glicina 10 mM, pH 1,7. Os sinais de associação e dissociação foram ajustados para ligação 1:1, utilizando *software* Biacore Evaluation Versão 2.0 para gerar constantes cinéticas (k_a & k_d) e para calcular as constantes de dissociação (K_d).

[0167] Os sensogramas são mostrados nas Figs 6A e 6B; e as constantes cinéticas e as constantes de dissociação são resumidas na Tabela 3. IL2vNM-IL33vCM e IL2vNM-IL33vNM ligados a ST2 humano com valores de K_d variando de 0,17 a 0,3 nM, que foram levemente mais baixos do que aqueles de interação de IL-33 e ST2 em peso previamente relatados (K_d = 0,4 a 0,7 nM) (Lingel *et al.*, 2009, Structure 17(10): 1398 - 1410; Liu *et al.*, 2013, PNAS 110(37): 14918 - 14923). Estas proteínas ligadas a ST2 de camundongo, mas com afinidade reduzida. Todas as moléculas biespecíficas e moléculas de IL-33 monovalentes mostraram afinidade comparável para ST2 humano. Entretanto, IL2vNM-IL33vCM mostrou afinidade mais alta (> 10 vezes) para ST2 de camundongo do que IL2vNM-IL33NM. Além disso, IL33vCM mostrou afinidade mais alta para ST2 de camundongo do que IL33vNM. Isto mostra que a orientação de IL-33 C-terminal tem afinidade mais alta para ST2 de camundongo do que IL-33 N-terminal.

[0168] Além disso, a amostra de IL2vNM-IL33vNM continha contaminação por homodímeros de IL2v detectável por SDS PAGE, enquanto que os homodímeros não foram detectáveis na amostra de IL2vNM-IL33vCM. Em conclusão, a proteína biespecífica de IL-33 C-terminal, IL2vNM-IL33vCM exibiu afinidade mais alta para ST2 de camundongo e foi expressada como uma proteína heterodimérica mais homogênea. Portanto, foi selecionada para ensaios de bioatividade com células T de camundongo no Exemplo 4.

Tabela 3. Análise de ligação de proteínas ECD de ST2 humano e de camundongo.

Analito	ST2	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_d (M)
IL2vNM-IL33vCM	Humano	5,15E6	8,69E-4	1,69E-10
	Camundongo	3,61E6	0,0492	1,36E-8

IL2vNM-IL33vNM	Humano	3,41E6	0,0010	3,02E-10
	Camundongo	1,17E6	0,1395	1,19E-7
IL33vNM	Humano	4,35E6	0,0012	2,74E-10
	Camundongo	2,33E6	0,1163	4,99E-8
IL33vCM	Humano	6,11E6	0,0011	1,74E-10
	Camundongo	3,85E6	0,0452	1,18E-8

Tabela 4. Ligação simultânea de proteínas tanto para ECD de ST2 quanto para ECD de IL2Ra

Ligante Capturado de ST2	Analito	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_d (M)
IL2vNM-IL33vCM	IL2R alfa	4,72E6	0,1236	2,62E-8
IL2vNM-IL33vNM	IL2R alfa	5,04E6	0,1575	3,25E-8

[0169] Para testar se as moléculas biespecíficas se ligam a ST2 e IL-2R alfa simultaneamente, as moléculas biespecíficas foram capturadas por ST2 humano etiquetado com histidina, que foi imobilizado no chip. Subsequentemente, IL2R alfa humana foi injetado como analito a uma taxa de fluxo de 50 µl/min por 50 s e deixado dissociar por 60 s. IL2R alfa foi preparado em várias concentrações (2,5 nM a 200 nM por diluição de 3 vezes). A superfície do chip foi regenerada com glicina 10 mM, pH 1,7. Os sinais de associação e dissociação foram ajustados para ligação 1:1, utilizando *software* Biacore Evaluation Versão 2.0 para gerar constantes cinéticas (k_a & k_d) e para calcular as constantes de dissociação (K_d).

[0170] Os sensogramas são mostrados na Fig 7, e as constantes cinéticas e as constantes de dissociação são resumidas na Tabela 4 acima. IL2vNM-IL33vCM e IL2vNM-IL33vNM ligados a IL2R alfa humana com valores de K_d (26 a 32 nM) comparáveis aos valores previamente relatados (Landgraf BE, *et al.*, 1992, J Biol Chem. 267(26): 18511 - 9; Myszka DG, *et al.*, 1996, Protein Sci. 5(12): 2468 - 78;

Shanafelt AB, *et al.*, 2.000, Nat Biotechnol. (11): 1197 - 202). Estes dados mostram que a porção IL-2v retém a ligação de IL2Ra; e as moléculas biespecíficas são capazes de se ligar a ST2 e IL2Ra simultaneamente porque elas se ligaram a IL2Ra ao serem ligadas à proteína de ST2.

Exemplo 3. Caracterização de ligação de moléculas biespecíficas anti-ST2/IL2v

[0171] Ligação de proteínas biespecíficas anti-ST2/IL2v a ST2 humano e IL2Ra foi avaliada por ressonância plasmônica de superfície (SPR) em uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 2.

[0172] Para a ligação de ST2, a proteína ECD de ST2 humano etiquetada com histidina foi capturada no chip como ligante. As moléculas biespecíficas Ab2-IL2v, que são compreendidas do Fab de mAb anti-ST2 (Ab2) e IL-2v, foram injetadas como analitos a uma taxa de fluxo de 50 µl/min por 400 s e deixadas dissociar por 600 s. As moléculas biespecíficas Ab2-IL2v foram preparadas em várias concentrações (0,012 nM a 1 nM por diluição de 3 vezes). As moléculas biespecíficas Ab4-IL2v, que são compreendidas do Fab de anti-ST2 mAb, Ab4 e IL-2v, foram injetadas como analito a uma taxa de fluxo de 50 µl/min por 200 s e deixadas dissociar por 400 s. As moléculas biespecíficas Ab4-IL2v foram preparadas em várias concentrações (0,062 nM a 5 nM por diluição de 3 vezes). A superfície do chip foi regenerada com glicina 10 mM, pH 1,7. Os sinais de associação e dissociação de moléculas biespecíficas anti-ST2 monovalentes foram ajustados para ligação 1:1, utilizando *software* Biacore Evaluation Versão 2.0 para gerar constantes cinéticas (k_a & k_d) e para calcular as constantes de dissociação (K_d).

[0173] Os sensogramas são mostrados nas Figs 8A e 8B; e as constantes cinéticas e as constantes de dissociação são resumidas na Tabela 5 abaixo. Todas as moléculas biespecíficas exibiram ligação clara para proteína de ST2. Os valores

de K_d de moléculas biespecíficas Ab2-IL2v monovalentes variaram de 94 pM a 137 pM em comparação com o valor relatado, 34 pM na patente US2017/0002079 A1. Os valores de K_d de moléculas biespecíficas Ab4/IL2v monovalentes variaram de 289 pM a 378 pM em comparação com o valor relatado, 301 pM na patente US2017/0002079 A1.

Tabela 5. Análise de ligação para proteína ECD de ST2 humano

Analito	Ligante	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_d (M)
Ab2M-IL2vCM	ST2 humano	3,28E6	3,47E-4	1,06E-10
Ab2M-IL2vNM	ST2 humano	3,34E6	3,17E-4	9,43E-11
Ab2M-IL2vCB	ST2 humano	2,50E6	3,44E-4	1,37E-10
Ab4M-IL2vCM	ST2 humano	5,57E6	0,0020	3,68E-10
Ab4M-IL2vNM	ST2 humano	5,44E6	0,0021	3,78E-10
Ab4M-IL2vCB	ST2 humano	6,16E6	0,0018	2,89E-10

[0174] Para testar se as moléculas biespecíficas se ligam a ST2 e IL2Ra simultaneamente, as moléculas biespecíficas foram capturadas por ST2 humano etiquetado com histidina, que foi imobilizado no chip. Subsequentemente, IL2R alfa foi injetado como analito a uma taxa de fluxo de 50 µl/min por 50 s e deixado dissociar por 60 s. IL2Ra foi preparado em várias concentrações (2,5 nM a 200 nM por diluição de 3 vezes). A superfície do chip foi regenerada com glicina 10 mM, pH 1,7. Os sinais de associação e dissociação foram ajustados para ligação 1:1, utilizando *software* Biacore Evaluation Versão 2.0 para gerar constantes cinéticas (k_a & k_d) e para calcular as constantes de dissociação (K_d).

[0175] Os sensogramas são mostrados nas Figuras 9A e 9B; e as constantes cinéticas e as constantes de dissociação são resumidas na Tabela 6 abaixo. Todas elas ligadas a IL2R alfa humana com valores de K_d (25 a 43 nM) comparáveis aos valores previamente relatados. Isto mostra que a porção IL2v retém a ligação de IL2Ra; e as moléculas biespecíficas são capazes de se ligar a ST2 e IL2Ra

simultaneamente porque elas mostraram se ligar a IL2Ra ao serem ligadas à proteína de ST2.

Tabela 6. Ligação simultânea de proteínas tanto para ECD de ST2 quanto para ECD de IL2Ra

Analito	Ligante ligado a ST2	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_d (M)
IL2R alfa humana	Ab2M-IL2vCM	6,73E6	0,1819	2,70E-8
IL2R alfa humana	Ab2M-IL2vNM	6,26E6	0,1550	2,48E-8
IL2R alfa humana	Ab2M-IL2vCB	5,78E6	0,1885	3,26E-8
IL2R alfa humana	Ab4M-IL2vCM	9,84E6	0,2513	2,55E-8
IL2R alfa humana	Ab4M-IL2vNM	7,14E6	0,1788	2,51E-8
IL2R alfa humana	Ab4M-IL2vCB	5,27E6	0,2002	3,80E-8
IL2R alfa humana	Ab2-IL2vCB	4,59E6	0,1633	3,56E-8
IL2R alfa humana	Ab2-IL2vCM	5,13E6	0,1677	3,27E-8
IL2R alfa humana	Ab4-IL2vCB	4,55E6	0,1944	4,27E-8
IL2R alfa humana	Ab4-IL2vCM	6,26E6	0,2568	4,10E-8

Exemplo 4. Atividade de IL2vNM-IL33vCM em Tregs ST2+ de camundongo

[0176] A ativação de células T por IL-2 pode ser acessada determinando-se o nível de STAT5 fosforilado (pSTAT5) nas células. pSTAT5 foi medido colorindo-se as células com um anticorpo anti-pSTAT5 e, depois separando-se vários subconjuntos de linfócitos por citometria de fluxo.

[0177] As Tregs ST2+ são encontradas em vários tecidos humanos a altos níveis, mas são encontrados no sangue a uma frequência muito baixa, <0,01 %. Devido à dificuldade de obter tecidos de doadores humanos, o efeito de IL2vNM-IL33vCM foi primeiro avaliado em Treg ST2+ do baço de camundongo, que encontrou-se ter níveis mais altos de Tregs ST2+ (5 a 10 % de Tregs), mais do que foram encontrados no sangue (0,1 a 1,0 % de Tregs). Os baços foram isolados de

camundongos C57Bl/6J, e as suspensões de célula única estimuladas com uma faixa de concentrações de IL2vNM (fusão Fc de variante de IL-2 monovalente), IL33vCM (fusão Fc de variante de IL-33 monovalente) ou IL2vNM-IL33vCM biespecíficas (Fig. 10). A ativação de Treg por IL-2 pode ser medida determinando-se o nível de STAT5 fosforilado intracelular (pSTAT5) por citometria de fluxo. IL33vCM induziu níveis marginais de pSTAT5 em apenas nas concentrações altas e não fisiológicas (10 a 100 nM, Fig. 8B). Ao contrário, IL2vNM induziu pSTAT5 em concentrações muito mais baixas, com uma EC50 de 2,4 nM em Treg ST2+ (Fig. 8A) e uma EC50 de 0,86 nM em Treg ST2- (Fig. 8B). A proteína biespecífica IL2vNM-IL33vCM melhorou a indução de pSTAT5 em Treg ST2+, acima dos níveis observados com proteínas IL33vCM ou IL2vNM sozinhas (Fig. 8A), mas naõ em Treg ST2- (Fig. 8B). A EC50 para IL2vNM-IL33vCM neste ensaio foi de 0,26 nM, que foi aproximadamente 10 vezes mais baixas do que a EC50 de IL2vNM. Em conclusão, IL2vNM-IL33vCM induziu mais pSTAT5 em Treg $ST2^+$ do que Treg ST2-, demonstrando que a molécula bispecífica preferencialmente ativa Treg ST2+.

Exemplo 5: Porções IL-33 C-terminal para a região Fc são mais ativas

[0178] A ligação de IL-33 a ST2 e o complexo de IL1RAcP ativam a sinalização através do adaptador MyD88. Os mecanismos de sinalização de IL-33 e efeitos a jusante variam em diferentes tipos de células. Portanto, uma linhagem celular reporter de sinalização foi escolhida para medir a bioatividade de proteínas contendo porções IL-33. A linhagem celular reporter HEK-Blue-IL-33™ (InVivoGen Inc) é uma linhagem celular à base de HEK293 superexpressando os receptores de IL-33 humana, que é uma leitura sensível de atividade de IL-33. A atividade das moléculas contendo IL-33 listadas na Tabela 1 foi testada quanto a sua capacidade de estimular a sinalização de IL-33 em células HEK-Blue-IL-33™ de acordo com o protocolo do fabricante.

[0179] Em comparação com moléculas monovalentes de IL-33v, a EC50 de IL-33vCM foi três vezes mais alta do que aquela de IL-33vNM (0,016 pM comparado a 0,053 pM, Tabela 7, Fig. 11A). Adicionando uma porção IL-33 adicional ao N-terminal da molécula de IL-33vNM não aumentou a EC50 (0,059 pM para IL-33vNB comparado a 0,053 pM para IL-33vNM). As moléculas biespecíficas com IL-2v e IL-33v fundidas ao N-terminal do domínio Fc através de um peptídeo ligante (IL2vNM-IL33vNM) tiveram apreciavelmente atividade de IL-33 mais baixa do que IL-33vNM monovalente (0,128 pM comparado a 0,053pM, Fig. 11), sugerindo uma perda de atividade devido à presença de ambas as porções N-terminal para o domínio Fc. Entretanto, as moléculas biespecíficas com IL-2 N-terminal para o domínio Fc e IL-33 C-terminal para o domínio Fc (IL2vNM-IL33vCM) tiveram melhor atividade do que qualquer uma das moléculas com IL-33 N-terminal para o domínio Fc (Tabela 7, 0,03 pM, Fig. 11B), e tieram apenas uma redução de duas vezes em atividade comparada à IL-33 C-terminal monovalente para o domínio Fc (IL-33vCM).

[0180] Compatível com a análise cinética no Exemplo 2, estes ensaios estabeleceram que IL2vNM-IL33vCM, com IL-33 C-terminal para o domínio Fc, tiveram atividade de bioatividade de IL-33 superior comparada a IL2vNM-IL33vNM (Fig 11). Portanto, a molécula IL2vNM-IL33vCM foi selecionada para os ensaios com células T reguladoras de camundongo como descrito acima no Exemplo 4.

Tabela 7: EC50 de ensaio de bioatividade de IL-33

Proteína	EC50 [pM]
IL-33vNM	0,053
IL-33vCM	0,016
IL-33vNB	0,059
IL2vNM-IL33vNM	0,128

IL2vNM-IL33vCM	0,03

Exemplo 6. Atividade de molécula bispecífica de IL2/IL-33 em camundongos normais (Prophetic).

[0181] Para determinar sua atividade em populações de Treg em camundongos normais, os camundongos BALB/c serão injetados intravenosamente com uma dose única de 0,001, 0,01, ou 0,1 mg/kg de proteínas IL2vNM, IL33vCM ou IL2vNM-IL33vCM biespecíficas (por exemplo, Fig. 4A). Baços e fígados serão colhidos 2, 4, 6 ou 8 dias depois do tratamento, e números e porcentagens (como uma fração de células CD4) de Treg $ST2^+$ serão determinados. Além disso, o índice proliferativo dos subconjuntos de Treg $ST2^+$ e $ST2^-$ serão determinados pela coloração intracelular de células com anticorpo para Ki67.

[0182] Se as IL2vNM-IL33vCM biespecíficas tivessem maior seletividada para Tregs $ST2^+$ do que as proteínas IL2vNM e IL33vCM, maior expansão de Tregs $ST2^+$ do que Tregs $ST2^-$ será observada após o tratamento com a proteína biespecífica comparada a IL2vNM e IL33vCM. Um aumento no índice proliferativo, como refletido pela porcentagem de células Ki67+, também resultará do tratamento com as proteínas biespecíficas comparadas a IL2vNM ou IL33vCM. Os efeitos das proteínas em Tregs podem ser correlacionados com a farmacocinética das proteínas administradas. Amostras de sangue tomadas depois da administração serão avaliadas por um imunoensaio quantitativo para determinar a farmacocinética de moléculas administradas.

Exemplo 7. Atividade em modelos de inflamação muscular (Prophetic).

[0183] O papel de Tregs $ST2^+$ foi estabelecido em modelos animais de inflamação muscular. Um daqueles modelos animais é lesão muscular aguda (Burzyn *et al.*, 2013, Cell 155(6): 1282 - 1295) em camundongos de tipo selvagem, e um segundo modelo é o modelo de distrofia muscular de camundongo *mdx*,

um modelo de inflamação muscular crônica causada por deficiência genética em distrofina (*mdx* mice; Villalta *et al.*, 2014, Sci Transl Med 5(258): 258ra142).

[0184] Lesão muscular aguda será iniciada em camundongos pela injeção de cardiotoxina nos músculos dos membros posteriores de camundongos C57Bl/6J, como descrito por Burzyn *et al.* (citado acima). O tratamento com 0,1 mg/kg de moléculas biespecíficas de IL-2-IL-33 (por exemplo, Fig. 4A e 4B) será iniciado no dia da lesão, e novamente no dia 7. Os camundongos serão sacrificados no dia 1, 4, 7 e 14, e o número de Tregs, Teff e outras células imunes infiltrantes no músculo será determinado por citometria de fluxo. A produção de anfirregulina (AREG) por Treg é um mediador crucial de reparação muscular (Burzyn *et al.*, citado acima), e a frequência de Treg AREG+ e o índice proliferativo (Treg Ki67+) serão determinados por citometria de fluxo intracelular. Medidas de lesão e reparação muscular, tais como níveis de creatina cinase na morfologia de fibras séricas musculares também serão avaliadas.

[0185] Para o modelo de distrofia muscular de camundongo mdx, o tratamento de camundongos mdx será iniciado a 2 semanas de idade. Os camundongos serão tratados semanalmente com 0,1 mg/kg de proteínas de teste e sacrificados a 6 semanas de idade. O número e a frequência de Treg (Ki67+) e Treg AREG+ proliferantes será medido nos músculos de camundongos tratados em comparação com os controles não tratados pareados por idade.

[0186] A ativação bem-sucedida de Tregs $ST2^+$ resultará em um aumento numérico em Treg, uma proporção mais alta de Treg Ki67+, ou uma proporção mais alta de Treg AREG+ no músculo. Adicionalmente, os camundongos podem exibir uma redução nas células Teff, uma diminuição na creatina cinase sérica e uma melhoria na morfologia muscular.

Exemplo 8. Atividade em modelos de doença inflamatória intestinal (Prophetic).

[0187] Um papel para Treg $ST2^+$ foi estabelecido em um modelo de camundongo de doença inflamatória intestinal (Schiering *et al.*, 2014, Nature 513(7519): 564 - 568). O efeito de proteínas de teste em Treg $ST2^+$ em tecido colônico será testado em um modelo agudo de doença inflamatória intestinal. Os camundongos C57Bl/6J serão alimentados com dextran sulfato de sódio (DSS) a 3 % na água potável por 7 dias. Os camundongos serão tratados IV, IP ou SC com 0,1 ou 0,4 mg/kg de moléculas biespecíficas de IL-2/IL-33 (por exemplo, Fig. 4A e 4B) no dia 1 e dia 4 de tratamento de DSS, com tratamento de DSS iniciando no dia 1. Depois do 7º dia de tratamento de DSS, os camundongos serão sacrificados, e os baços, os cólons e os linfonodos mesentéricos (MLNs) colhidos. As seções do cólon serão analisadas por histologia quanto à severidade da doença e às pontuações de colite. As populações de Treg $ST2^+$ serão medidas nos baços, cólons e MLNs.

[0188] O tratamento bem-sucedido pode resultar em perda de peso reduzida, pontuações ou histologia da doença melhoradas em camundongos tratados em comparação com os controles. A melhoria da doença pode ser acompanhada por um aumento específico em Treg Ki67+ $ST2^+$ proliferantes nos cólons e MLNs de camundongos tratados.

[0189] Embora as modalidades preferidas da presente invenção tenham sido mostradas e descritas aqui, será óbvio aos técnicos no assunto que tais modalidades são fornecidas apenas a título de exemplo. Numerosas variações, alterações e substituições ocorrerão agora aos técnicos no assunto sem se afastarem da invenção. Deve ser entendido que várias alternativas às modalidades da invenção aqui descritas podem ser utilizadas na prática da invenção. Pretende-se que as seguintes reivindicações definam o escopo da invenção e que os métodos e estruturas dentro do escopo destas reivindicações e seus equivalentes sejam abrangidos por este meio.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão, **caracterizada** pelo fato de que compreende:

a) um domínio proteico de IL-2 humana, em que o domínio proteico de IL-2 humana compreende IL-2 humana com uma substituição selecionada a partir do grupo que consiste em: T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L, e Q126F, em relação à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

b) um domínio proteico Fc de imunoglobulina; e

c) um anticorpo específico para receptor tipo 1 da Interleucina 1 (ST2), ou um fragmento de ligação ao antígeno deste.

2. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda pelo menos um domínio de peptídeo ligante.

3. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o domínio proteico Fc de imunoglobulina compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na variante Fc de IgG1 humana de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 9.

4. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de peptídeo ligante compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

5. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda um primeiro domínio de peptídeo ligante e um segundo domínio de peptídeo ligante.

6. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

7. Proteína dimérica, **caracterizada** pelo fato de que compreende a proteína de fusão definida na reivindicação 1.

8. Proteína dimérica, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma primeira proteína de fusão e uma segunda proteína de fusão, em que:

a. cada proteína de fusão compreende um domínio proteico Fc de imunoglobulina (IgG) e pelo menos um domínio proteico adicional selecionado a partir do grupo que consiste em:

i. um domínio proteico de IL-2 humana, em que o domínio proteico de IL-2 humana compreende IL-2 humana com uma substituição selecionada a partir do grupo que consiste em: T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L e Q126F, em relação à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e

ii. um anticorpo específico para receptor tipo 1 da Interleucina 1 (ST2), ou um fragmento de ligação ao antígeno deste; e

b. a proteína dimérica compreende pelo menos um domínio proteico de IL-2 humana e pelo menos um de o anticorpo específico para ST2 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste.

9. Proteína dimérica de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos uma das proteínas de fusão compreende ainda pelo menos um domínio de peptídeo ligante.

10. Proteína dimérica de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que o domínio proteico Fc de imunoglobulina compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na variante Fc de IgG1 humana de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 9.

11. Proteína dimérica de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de peptídeo ligante compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

12. Proteína dimérica de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que a primeira proteína de fusão compreende a sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO: 28, a segunda proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e a proteína dimérica compreende ainda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

13. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de que compreende a proteína dimérica definida na reivindicação 8.

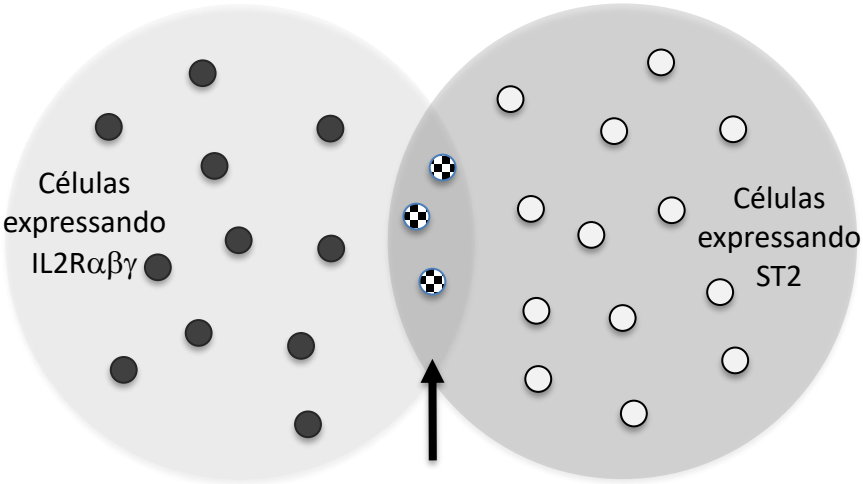


FIG. 1

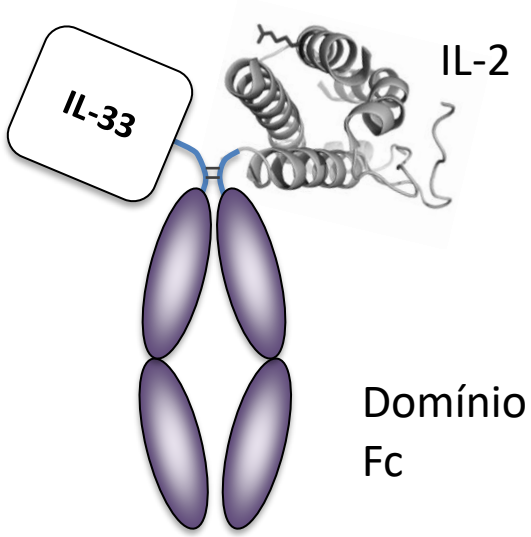


FIG. 2



FIG. 3A

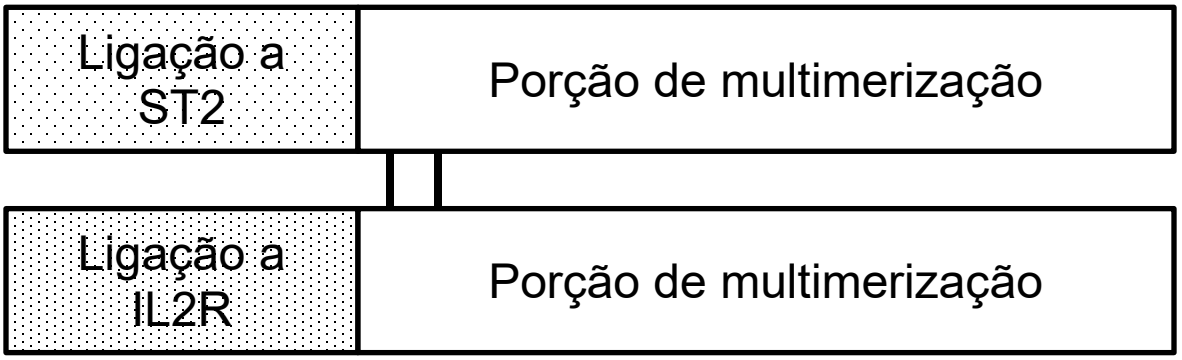


FIG. 3B

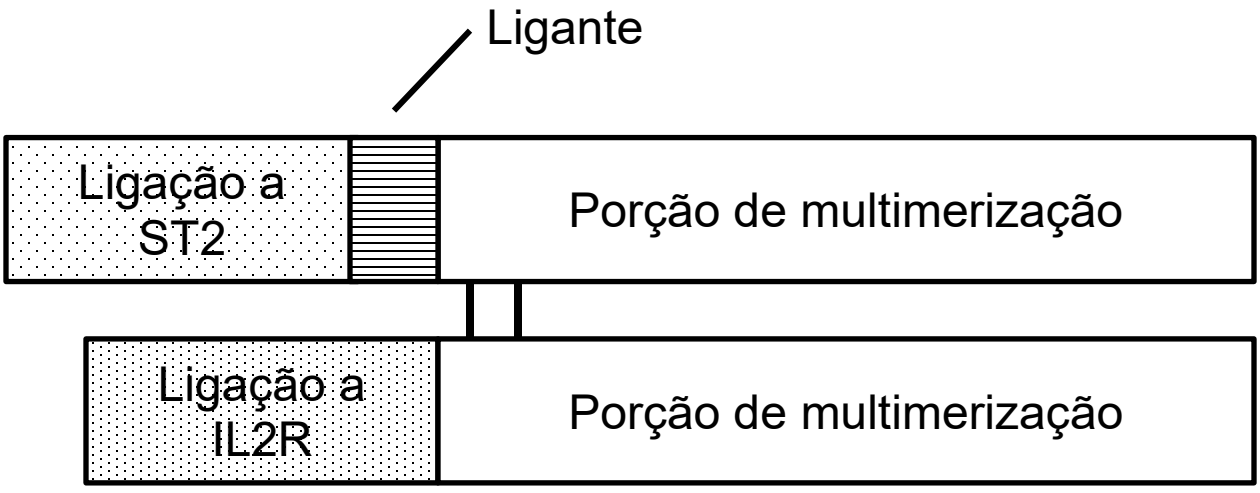


FIG. 3C

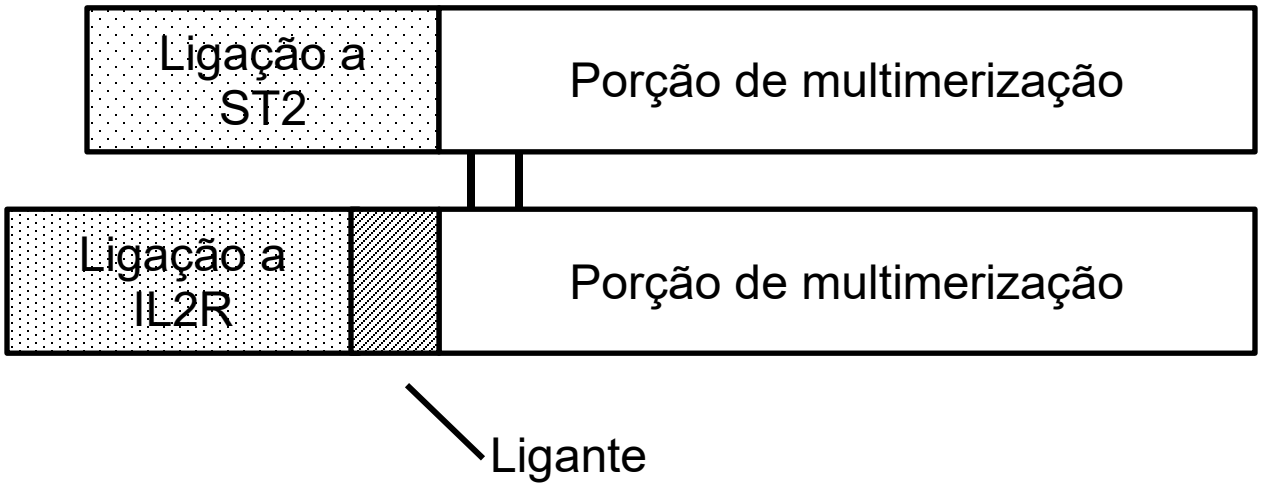

Ligação a ST2
Porção de multimerização
Ligação a IL2R
Porção de multimerização
Ligante

FIG. 3D

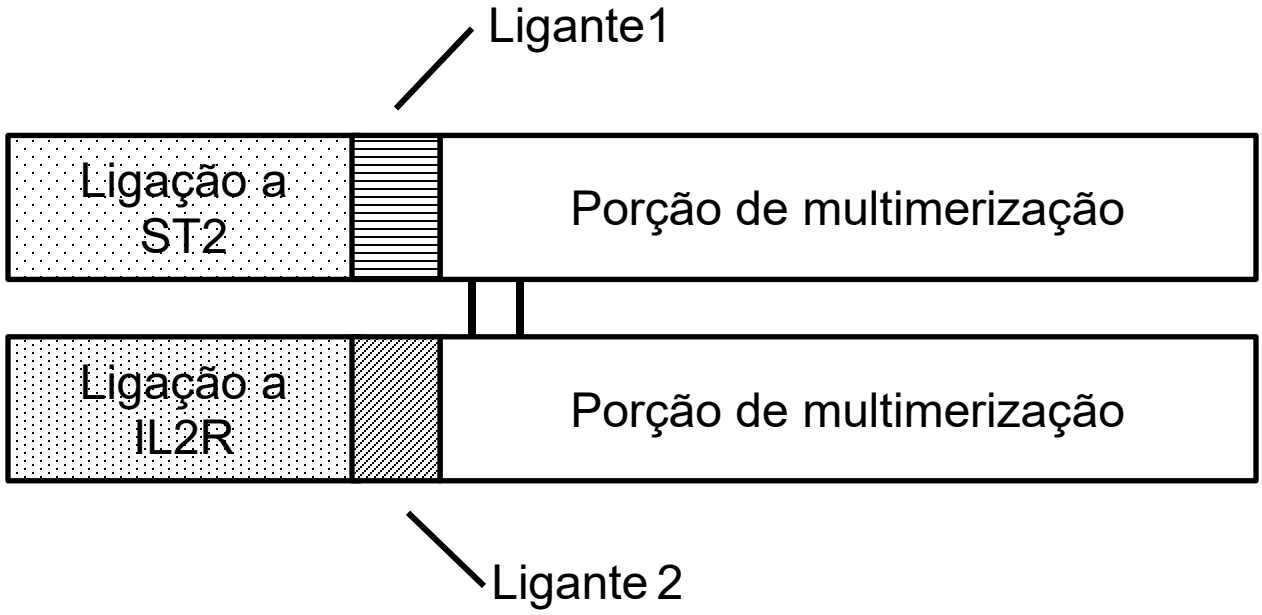

Ligante1
Ligação a ST2
Porção de multimerização
Ligação a IL2R
Porção de multimerização
Ligante 2

FIG. 3E

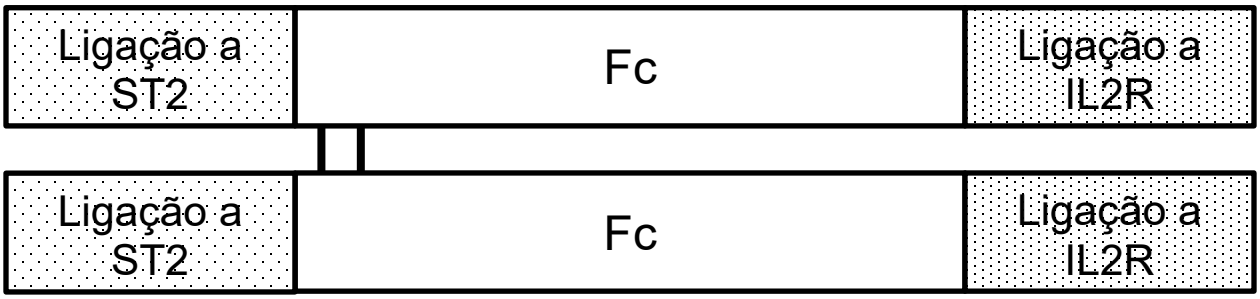
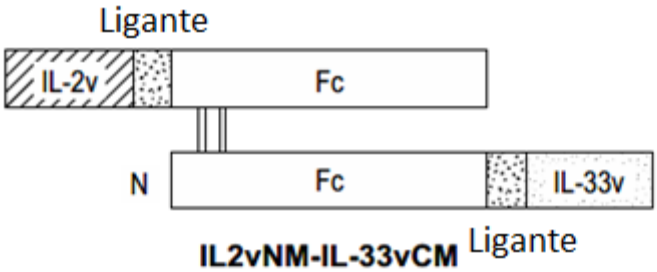
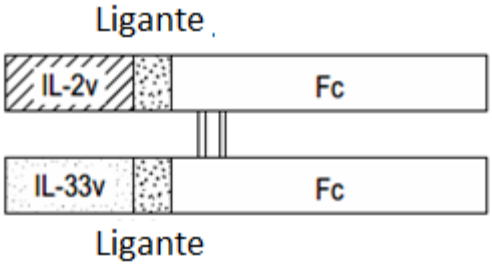

Ligação a ST2
Fc
Ligação a IL2R
Ligação a ST2
Fc
Ligação a IL2R

FIG. 3F



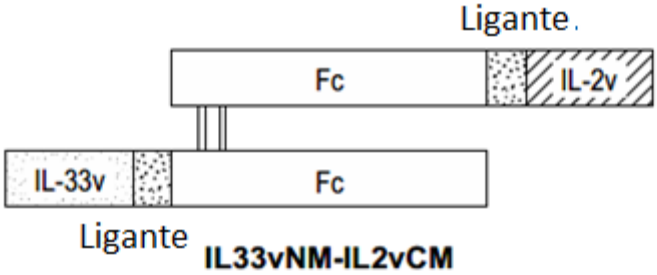
IL2vNM-IL-33vCM

FIG. 4A



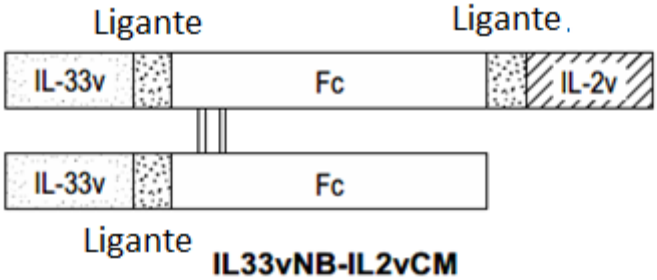
IL2vNM-IL33vNM

FIG. 4B



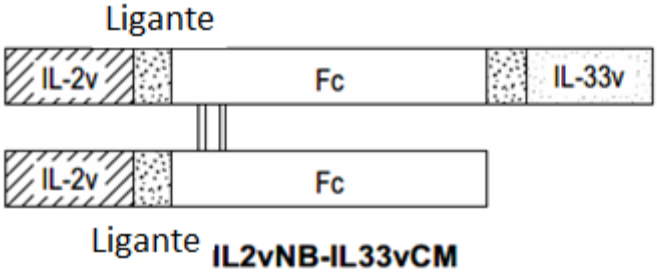
IL33vNM-IL2vCM

FIG. 4C



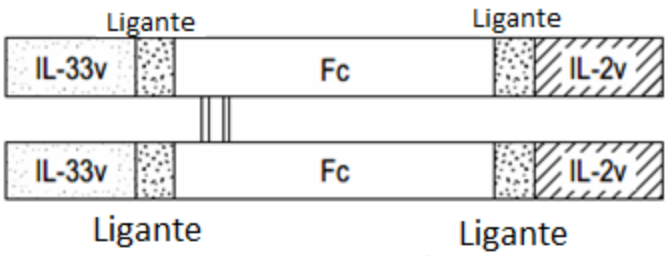
IL33vNB-IL2vCM

FIG. 4D



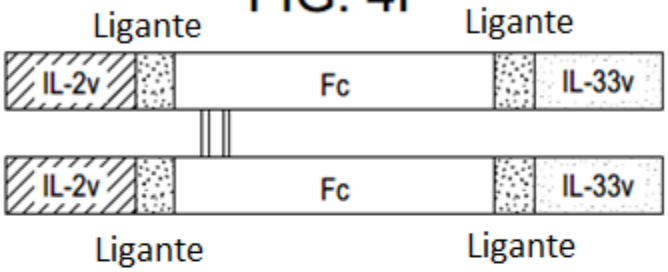
IL2vNB-IL33vCM

FIG. 4E



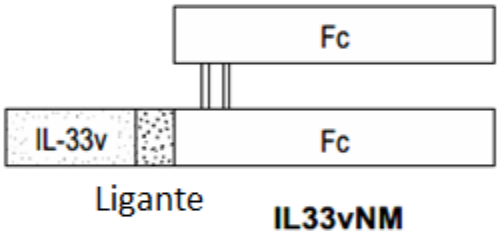
IL33vNB-IL2vCB

FIG. 4F



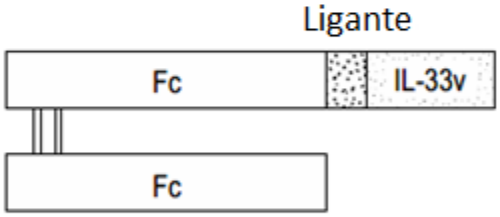
IL2vNB-IL33vCB

FIG. 4G



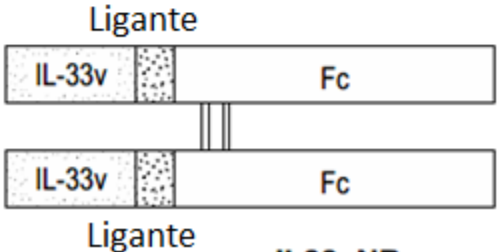
IL33vNM

FIG. 4H



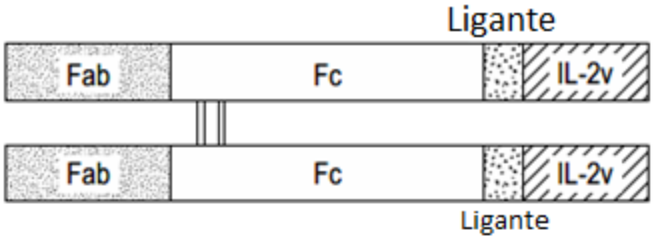
IL33vCM

FIG. 4I



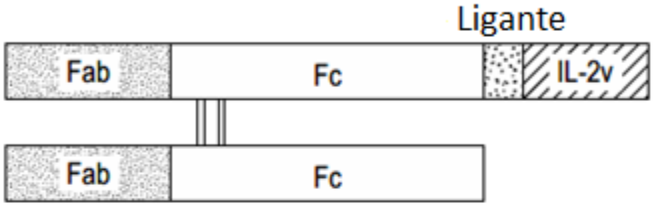
IL33vNB

FIG. 4J



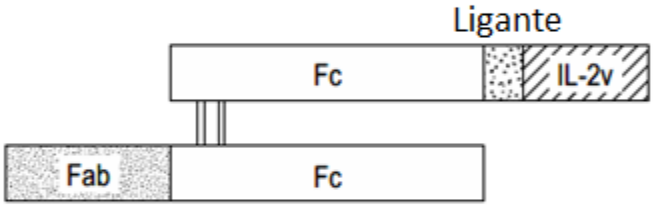
Ab2-IL2vCB & Ab4-IL2vCB

FIG. 5A



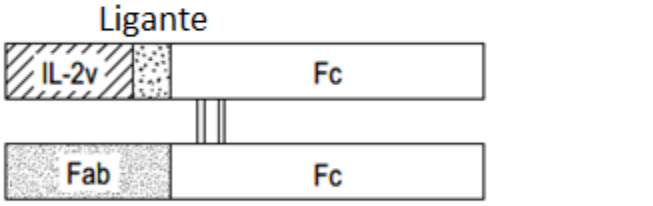
Ab2-IL2vCM & Ab4-IL2vCM

FIG. 5B



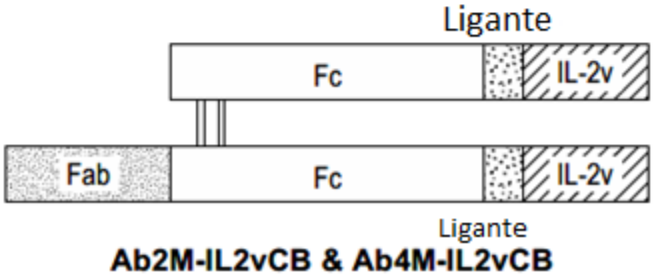
Ab2M-IL2vCM & Ab4M-IL2vCM

FIG. 5C



Ab2M-IL2vNM & Ab4M-IL2vNM

FIG. 5D



Ab2M-IL2vCB & Ab4M-IL2vCB

FIG. 5E

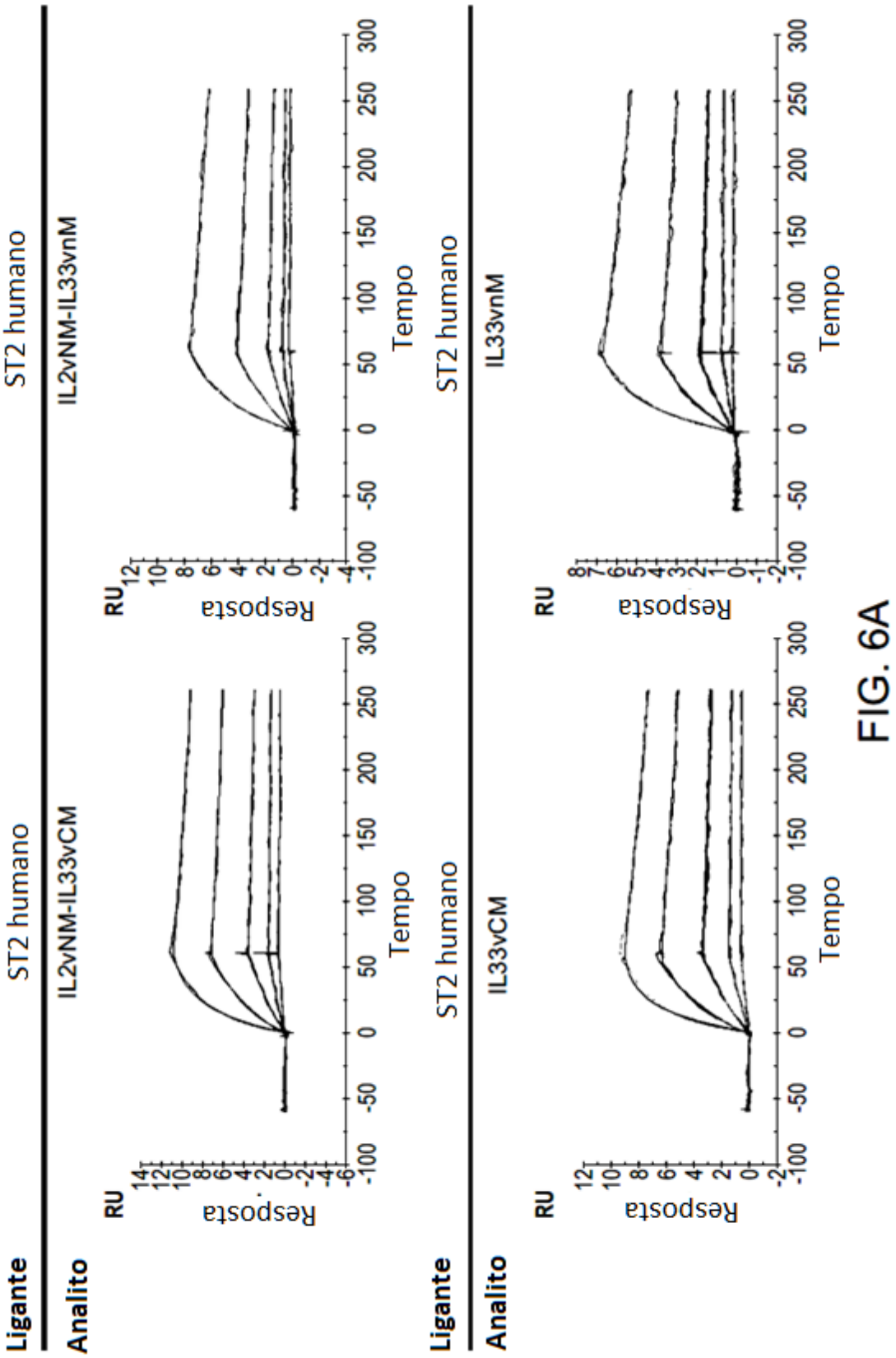

Ligante
ST2 humano
Analito
IL2vNM-IL33vnM
RU
Resposta
Tempo
Ligante
ST2 humano
Analito
IL2vNM-IL33vCM
RU
Resposta
Tempo
Ligante
ST2 humano
Analito
IL33vnM
RU
Resposta
Tempo
Ligante
ST2 humano
Analito
IL33vCM
RU
Resposta
Tempo

FIG. 6A

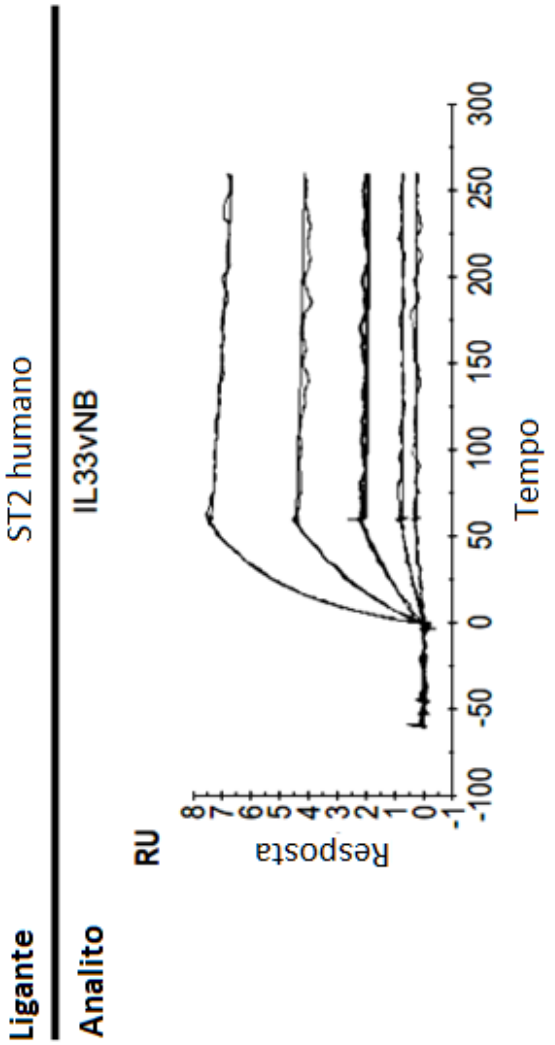


FIG. 6A continuada

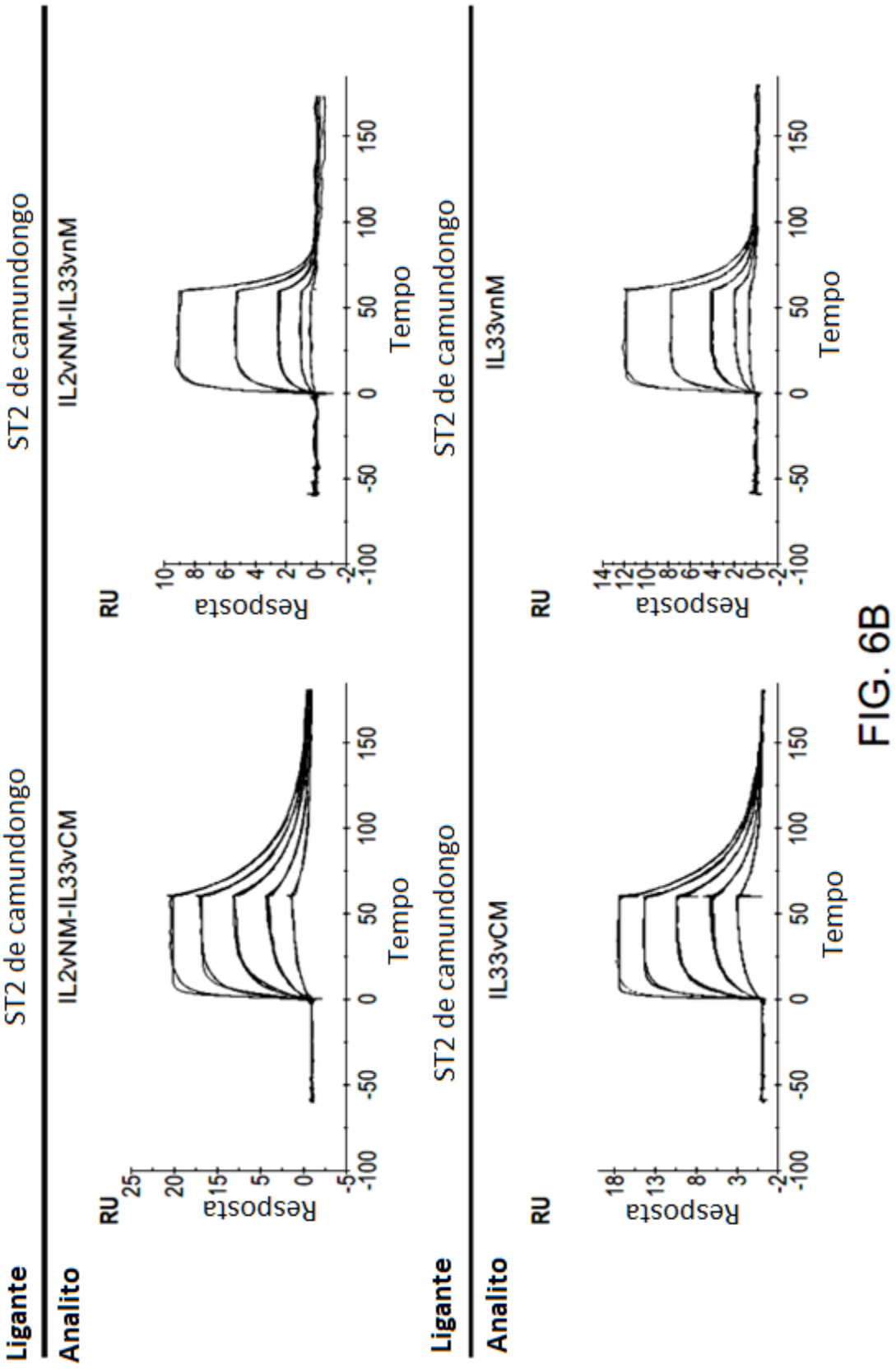

Ligante
ST2 de camundongo
ST2 de camundongo
Analito
IL2vNM-IL33vCM
IL2vNM-IL33vnM
RU
Resposta
Tempo
Ligante
ST2 de camundongo
ST2 de camundongo
Analito
IL33vCM
IL33vnM
RU
Resposta
Tempo

FIG. 6B

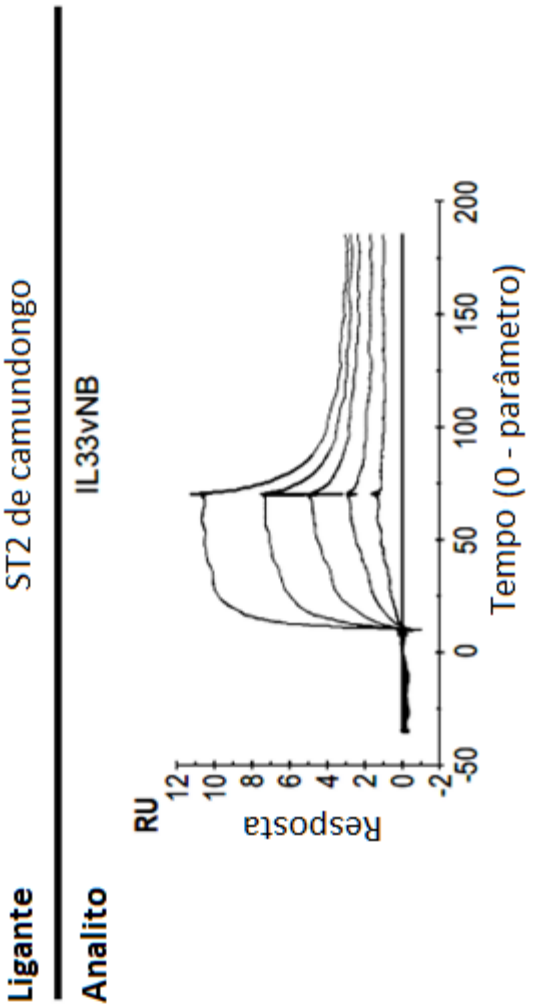


FIG. 6B continuada

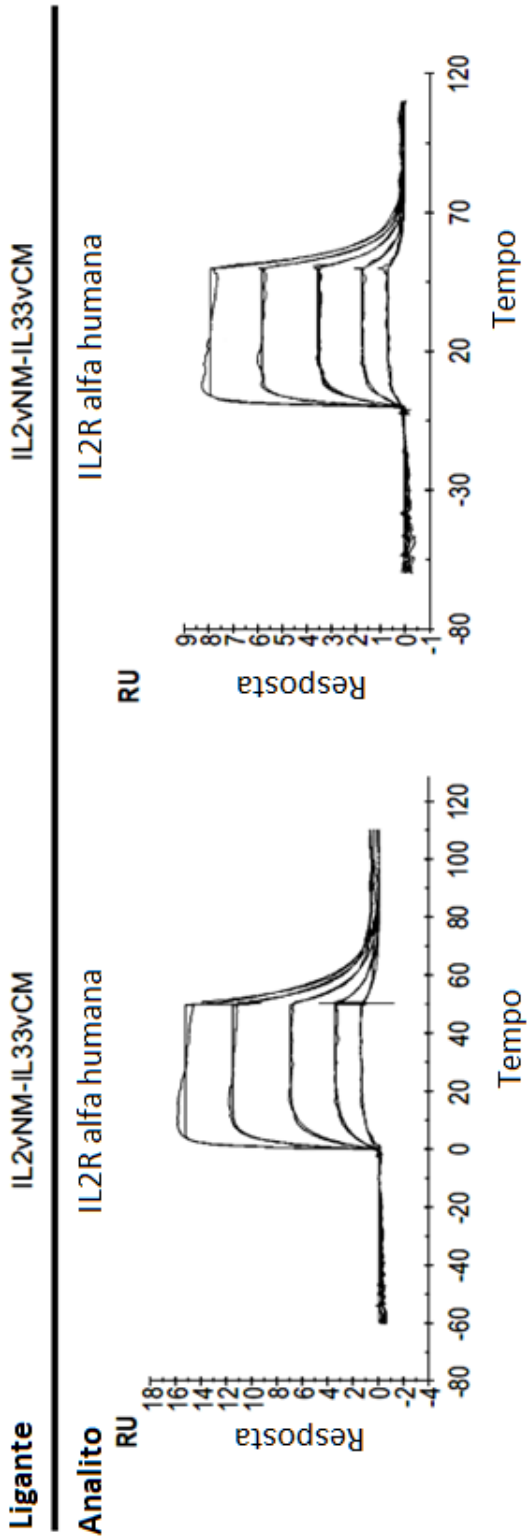

Ligante
IL2vNM-IL33vCM
IL2vNM-IL33vCM
Analito
IL2R alfa humana
IL2R alfa humana
RU
Resposta
Tempo
RU
Resposta
Tempo

FIG. 7

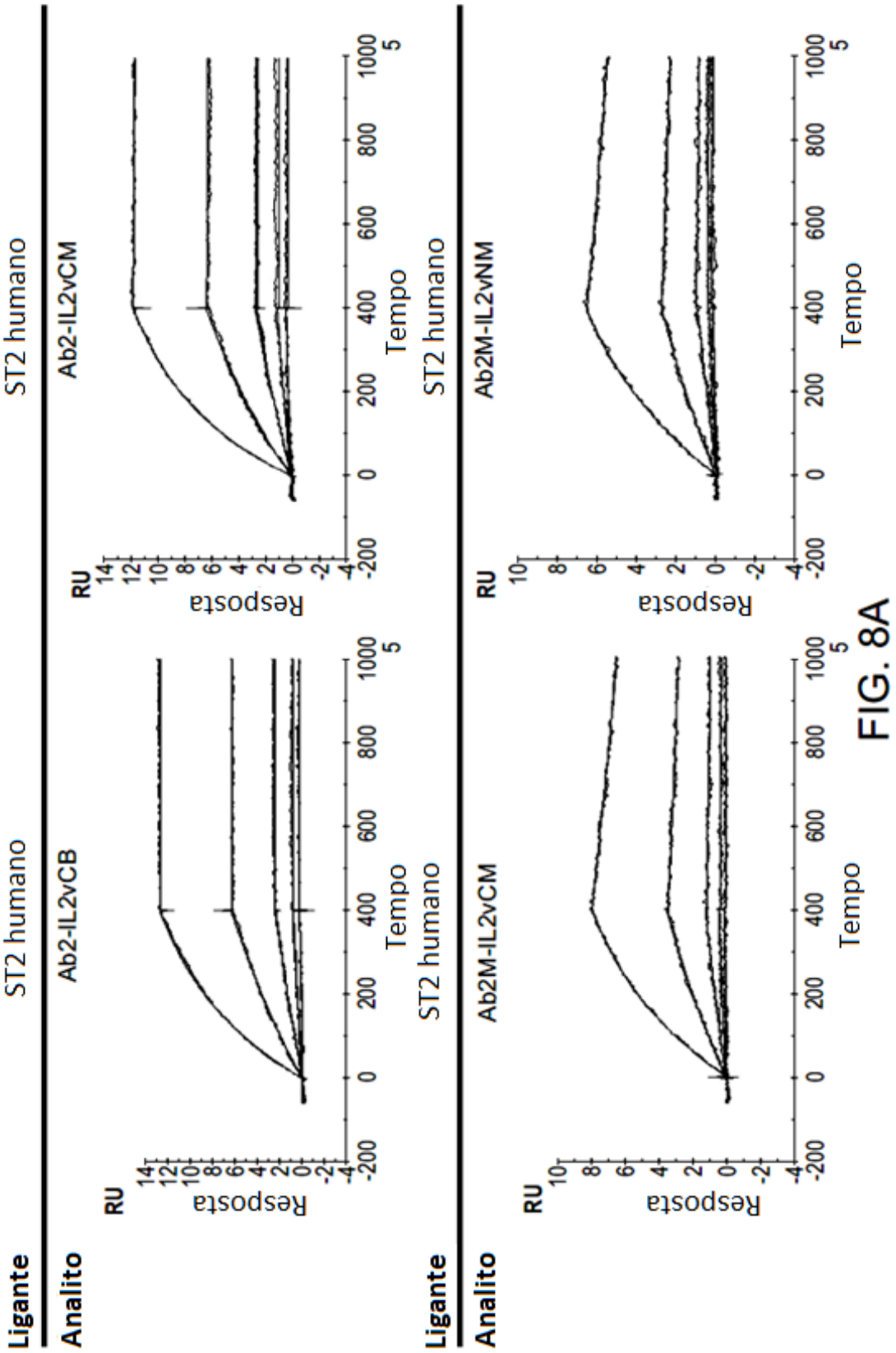

Ligante
ST2 humano
Analito
Ab2-IL2vCB
RU
Resposta
Tempo
Ligante
ST2 humano
Analito
Ab2-IL2vCM
RU
Resposta
Tempo
Ligante
ST2 humano
Analito
Ab2M-IL2vCM
RU
Resposta
Tempo
Ligante
ST2 humano
Analito
Ab2M-IL2vNM
RU
Resposta
Tempo

FIG. 8A

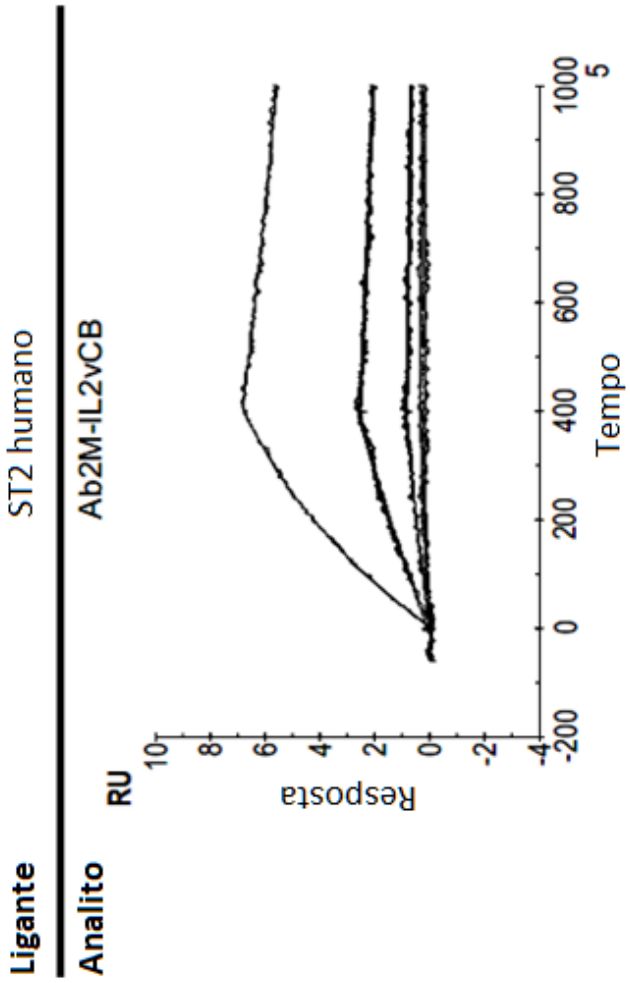


FIG. 8A continuada

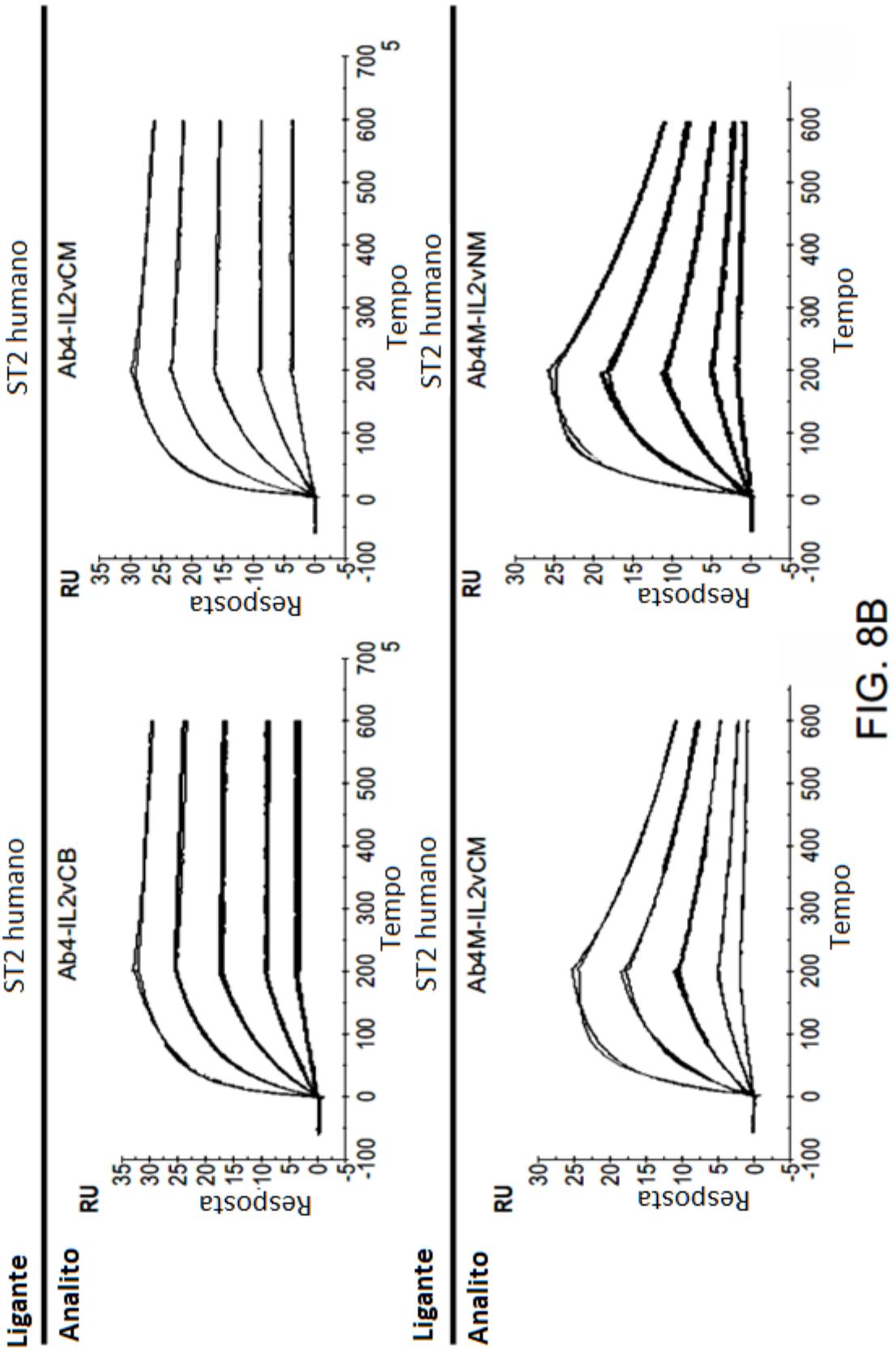

Ligante
ST2 humano
Analito
Ab4-IL2vCB
RU
Resposta
Tempo
Ligante
ST2 humano
Analito
Ab4-IL2vCM
RU
Resposta
Tempo
Ligante
ST2 humano
Analito
Ab4M-IL2vCM
RU
Resposta
Tempo
Ligante
ST2 humano
Analito
Ab4M-IL2vNM
RU
Resposta
Tempo

FIG. 8B

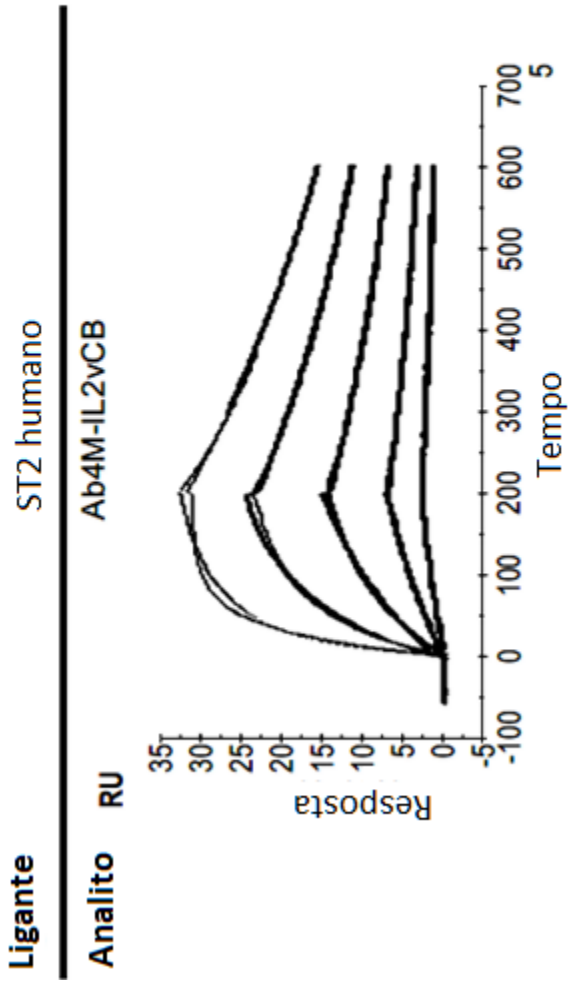


FIG. 8B continuada

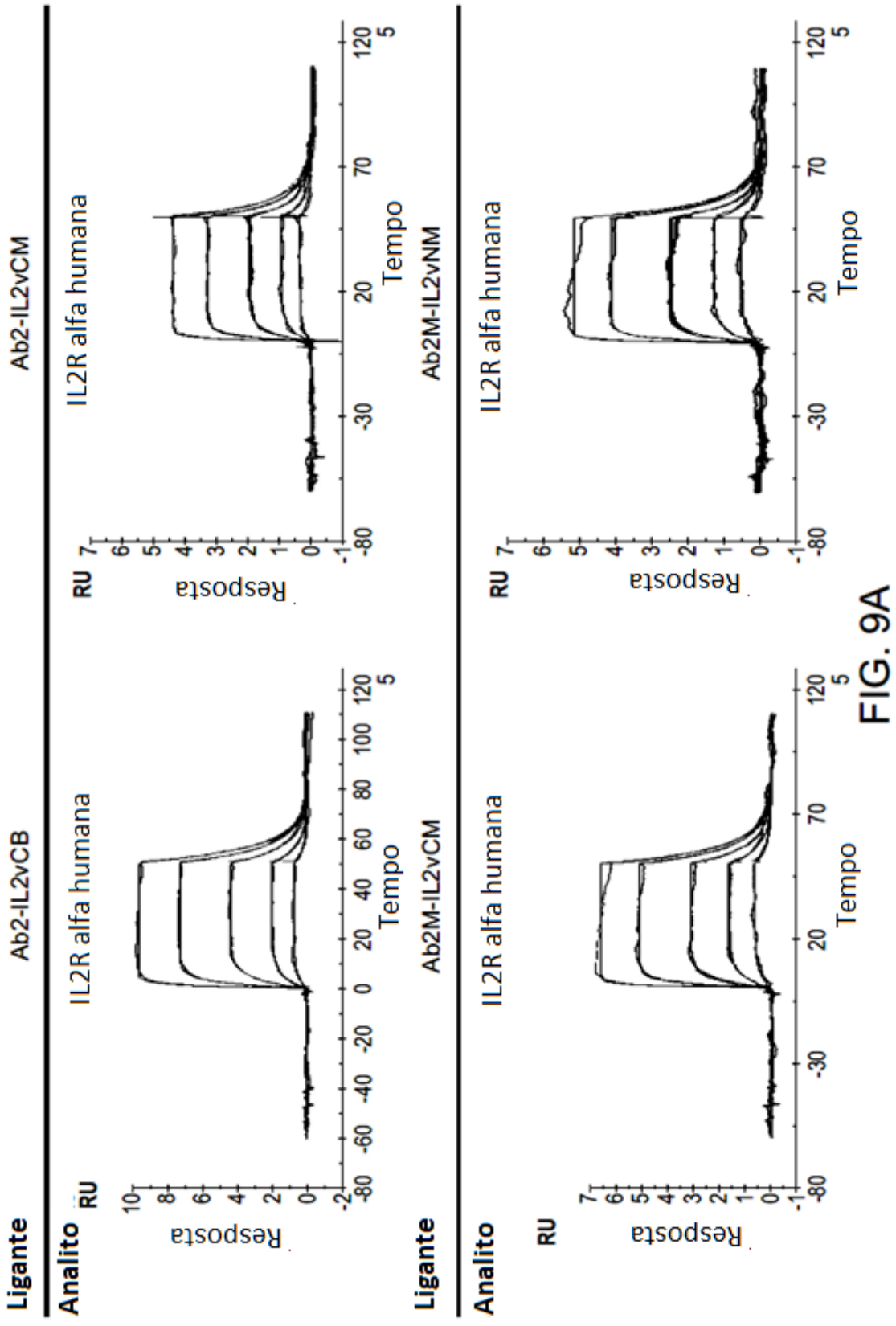

Ligante
Ab2-IL2vCB
Ab2-IL2vCM
Analito
IL2R alfa humana
RU
Resposta
Tempo
Ligante
Ab2M-IL2vCM
Ab2M-IL2vNM
Analito
IL2R alfa humana
RU
Resposta
Tempo

FIG. 9A

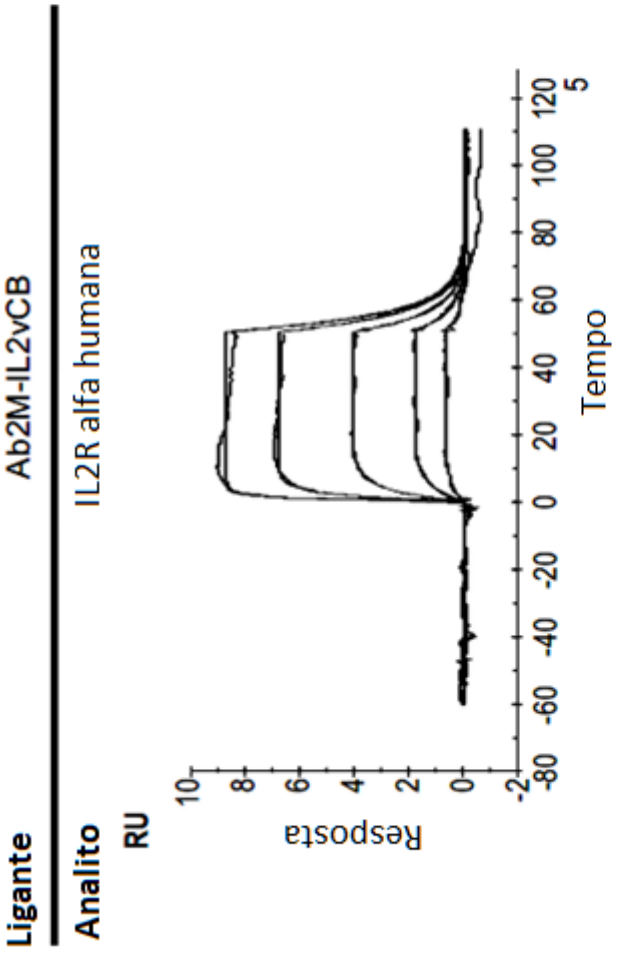


FIG. 9A continuada

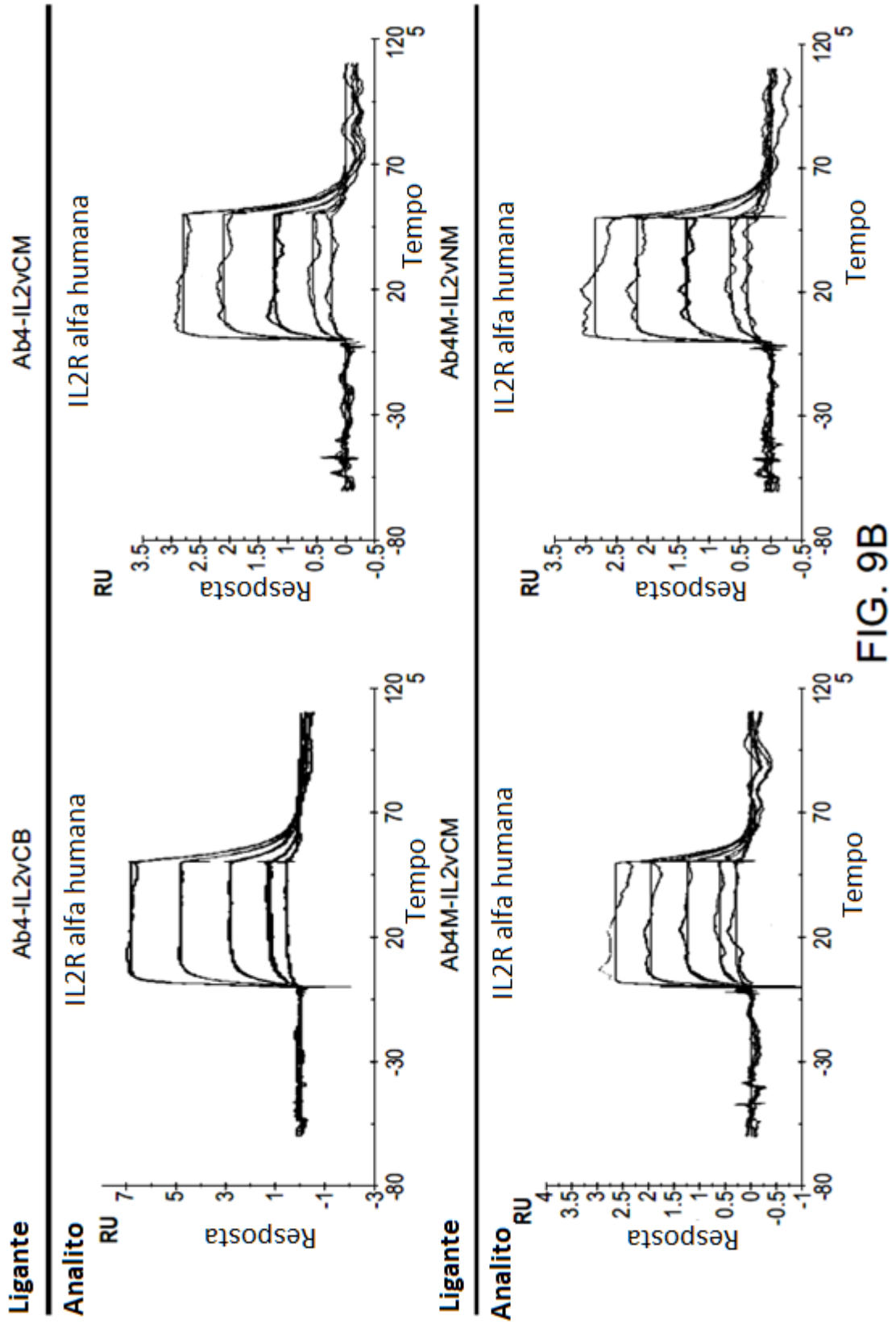

Ligante
Ab4-IL2vCB
Ab4-IL2vCM
Analito
IL2R alfa humana
RU
Resposta
Tempo
Ligante
Ab4M-IL2vCM
Ab4M-IL2vNM
Analito
IL2R alfa humana
RU
Resposta
Tempo

FIG. 9B

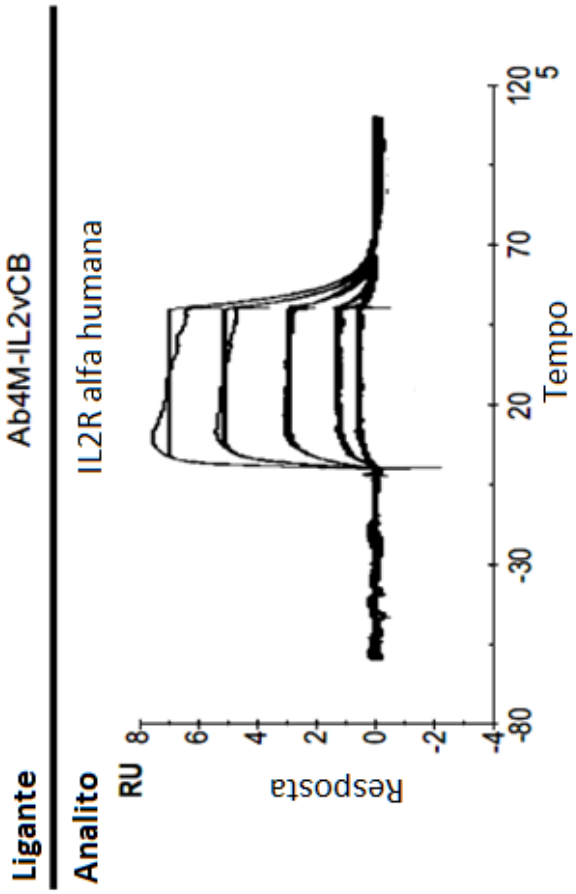


FIG. 9B continuada

FIG. 10A

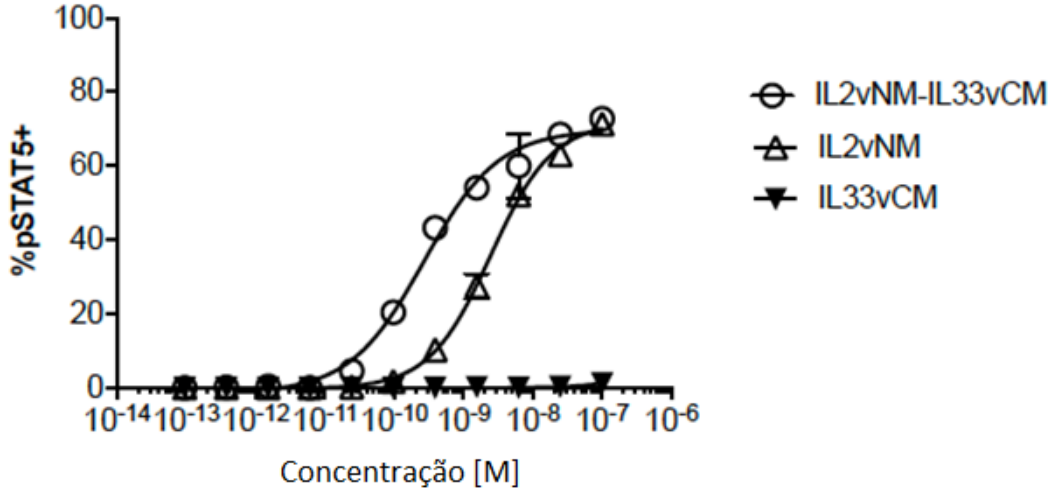
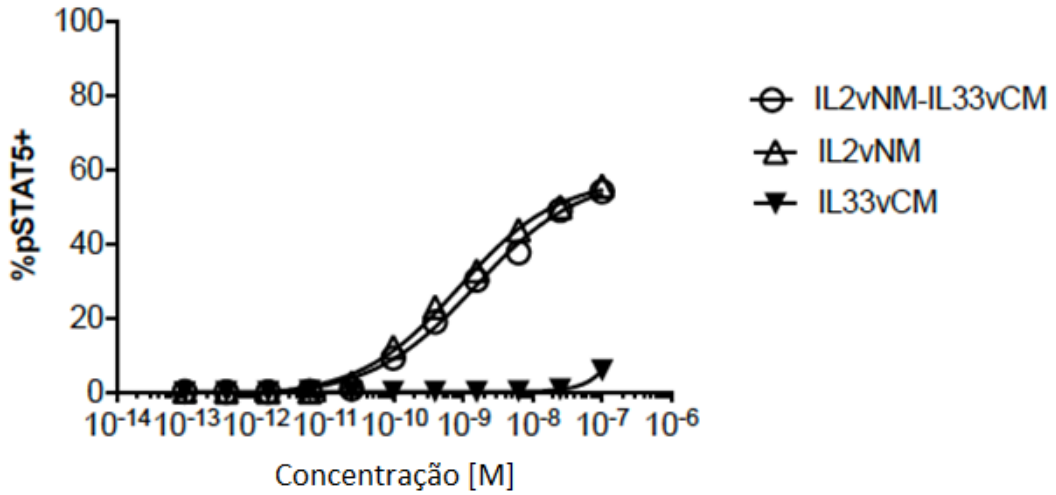


FIG. 10B



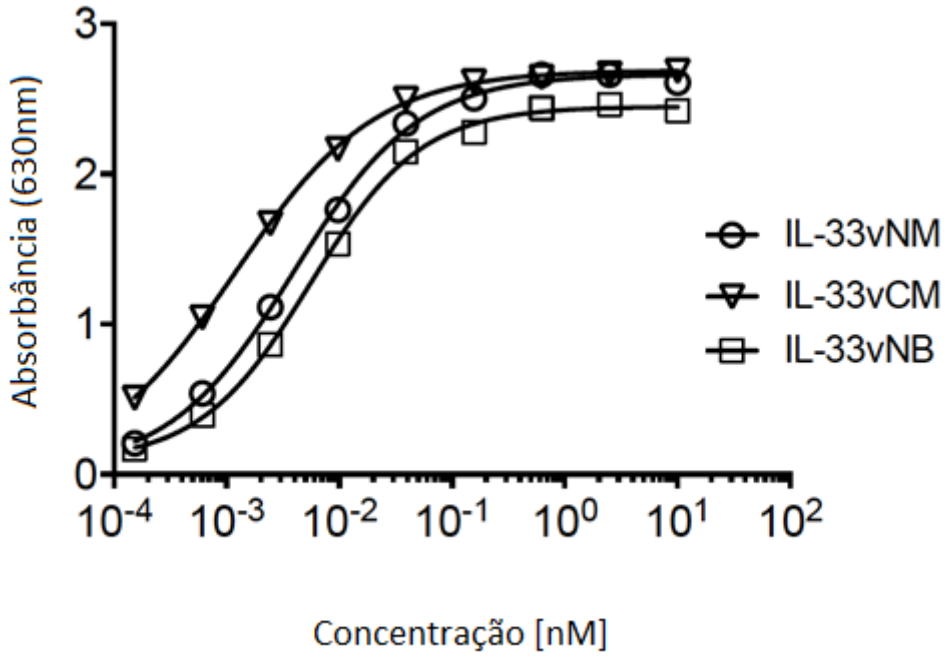


FIG. 11A

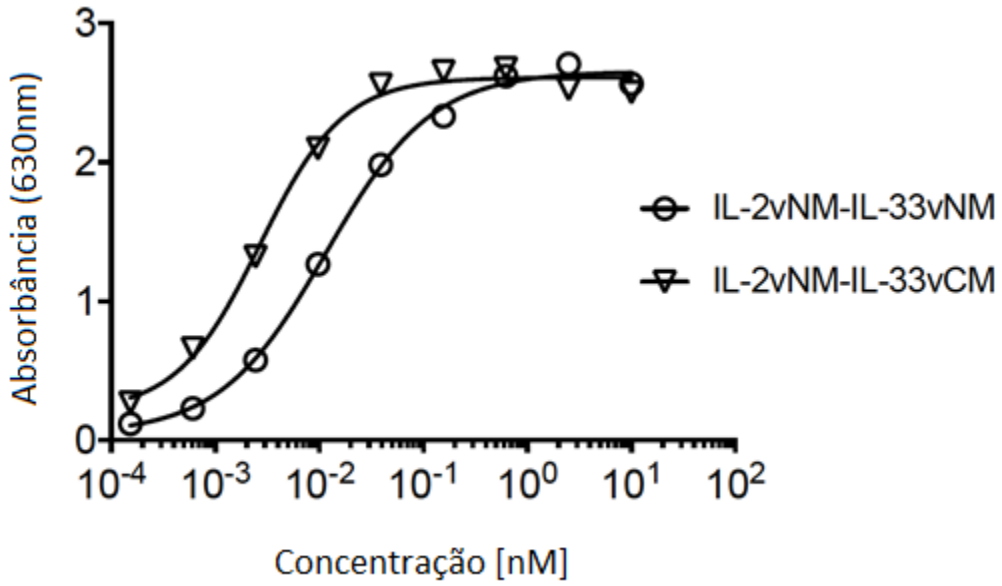


FIG. 11B