

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

**(21) BR 112019014691-1 A2**



**(22) Data do Depósito: 18/01/2018**

**(43) Data da Publicação Nacional: 07/04/2020**

**(54) Título: MUTEÍNAS DE LIPOCALINA COM AFINIDADE DE LIGAÇÃO PARA LAG-3**

**(51) Int. Cl.: C07K 14/47; A61K 38/00.**

**(30) Prioridade Unionista: 18/01/2017 EP 17151945.7.**

**(71) Depositante(es): PIERIS PHARMACEUTICALS GMBH.**

**(72) Inventor(es): CHRISTINE ROTHE; SHANE OLWILL; ANDREA ALLERSDORFER; TIMO EICHNER; RACHIDA SIHAM BEL AIBA; MARINA PAVLIDOU.**

**(86) Pedido PCT: PCT EP2018051139 de 18/01/2018**

**(87) Publicação PCT: WO 2018/134274 de 26/07/2018**

**(85) Data da Fase Nacional: 17/07/2019**

**(57) Resumo:** A presente invenção refere-se a muteínas de lipocalina lacrimal humana que se ligam especificamente a LAG-3, que pode ser usado em aplicações farmacêuticas, por exemplo, como agentes anticâncer e/ou moduladores imunes para o tratamento ou prevenção de doenças humanas, tal como câncer, doenças infecciosas e doenças autoimunes. A presente descrição mostra, ainda, as muteínas de lipocalina humanas podem inibir a ligação de LAG-3 a MHC classe II em células que superexpressam MHC classe II. A presente descrição também se refere a métodos para produzir muteínas de lipocalina de ligação a LAG-3 descritas no presente documento assim como composições que compreendem tais muteínas de lipocalina. A presente descrição refere-se, ainda, a moléculas de ácido nucleico que codificam tais muteínas de lipocalina e a métodos para geração de tais muteínas de lipocalina e moléculas de ácido nucleico. Adicionalmente, o pedido descreve usos terapêuticos e/ou diagnósticos dessas muteínas de lipocalina assim como composições que compreendem uma ou mais de tais muteínas de lipocalina.

SG1019014691-1  
SG1019014691-2  
SG1019014691-3  
SG1019014691-4  
SG1019014691-5  
SG1019014691-6  
SG1019014691-7  
SG1019014691-8  
SG1019014691-9  
SG1019014691-10  
SG1019014691-11  
SG1019014691-12  
SG1019014691-13  
SG1019014691-14  
SG1019014691-15  
SG1019014691-16  
SG1019014691-17  
SG1019014691-18  
SG1019014691-19  
SG1019014691-20  
SG1019014691-21  
SG1019014691-22  
SG1019014691-23  
SG1019014691-24  
SG1019014691-25  
SG1019014691-26  
SG1019014691-27  
SG1019014691-28  
SG1019014691-29  
SG1019014691-30  
SG1019014691-31  
SG1019014691-32  
SG1019014691-33  
SG1019014691-34  
SG1019014691-35  
SG1019014691-36  
SG1019014691-37  
SG1019014691-38  
SG1019014691-39  
SG1019014691-40  
SG1019014691-41  
SG1019014691-42  
SG1019014691-43  
SG1019014691-44  
SG1019014691-45  
SG1019014691-46  
SG1019014691-47  
SG1019014691-48  
SG1019014691-49  
SG1019014691-50  
SG1019014691-51  
SG1019014691-52  
SG1019014691-53  
SG1019014691-54  
SG1019014691-55  
SG1019014691-56  
SG1019014691-57  
SG1019014691-58  
SG1019014691-59  
SG1019014691-60  
SG1019014691-61  
SG1019014691-62  
SG1019014691-63  
SG1019014691-64  
SG1019014691-65  
SG1019014691-66  
SG1019014691-67  
SG1019014691-68  
SG1019014691-69  
SG1019014691-70  
SG1019014691-71  
SG1019014691-72  
SG1019014691-73  
SG1019014691-74  
SG1019014691-75  
SG1019014691-76  
SG1019014691-77  
SG1019014691-78  
SG1019014691-79  
SG1019014691-80  
SG1019014691-81  
SG1019014691-82  
SG1019014691-83  
SG1019014691-84  
SG1019014691-85  
SG1019014691-86  
SG1019014691-87  
SG1019014691-88  
SG1019014691-89  
SG1019014691-90  
SG1019014691-91  
SG1019014691-92  
SG1019014691-93  
SG1019014691-94  
SG1019014691-95  
SG1019014691-96  
SG1019014691-97  
SG1019014691-98  
SG1019014691-99  
SG1019014691-100  
SG1019014691-101  
SG1019014691-102  
SG1019014691-103  
SG1019014691-104  
SG1019014691-105  
SG1019014691-106  
SG1019014691-107  
SG1019014691-108  
SG1019014691-109  
SG1019014691-110  
SG1019014691-111  
SG1019014691-112  
SG1019014691-113  
SG1019014691-114  
SG1019014691-115  
SG1019014691-116  
SG1019014691-117  
SG1019014691-118  
SG1019014691-119  
SG1019014691-120  
SG1019014691-121  
SG1019014691-122  
SG1019014691-123  
SG1019014691-124  
SG1019014691-125  
SG1019014691-126  
SG1019014691-127  
SG1019014691-128  
SG1019014691-129  
SG1019014691-130  
SG1019014691-131  
SG1019014691-132  
SG1019014691-133  
SG1019014691-134  
SG1019014691-135  
SG1019014691-136  
SG1019014691-137  
SG1019014691-138  
SG1019014691-139  
SG1019014691-140  
SG1019014691-141  
SG1019014691-142  
SG1019014691-143  
SG1019014691-144  
SG1019014691-145  
SG1019014691-146  
SG1019014691-147  
SG1019014691-148  
SG1019014691-149  
SG1019014691-150  
SG1019014691-151  
SG1019014691-152  
SG1019014691-153  
SG1019014691-154  
SG1019014691-155  
SG1019014691-156  
SG1019014691-157  
SG1019014691-158  
SG1019014691-159  
SG1019014691-160  
SG1019014691-161  
SG1019014691-162  
SG1019014691-163  
SG1019014691-164  
SG1019014691-165  
SG1019014691-166  
SG1019014691-167  
SG1019014691-168  
SG1019014691-169  
SG1019014691-170  
SG1019014691-171  
SG1019014691-172  
SG1019014691-173  
SG1019014691-174  
SG1019014691-175  
SG1019014691-176  
SG1019014691-177  
SG1019014691-178  
SG1019014691-179  
SG1019014691-180  
SG1019014691-181  
SG1019014691-182  
SG1019014691-183  
SG1019014691-184  
SG1019014691-185  
SG1019014691-186  
SG1019014691-187  
SG1019014691-188  
SG1019014691-189  
SG1019014691-190  
SG1019014691-191  
SG1019014691-192  
SG1019014691-193  
SG1019014691-194  
SG1019014691-195  
SG1019014691-196  
SG1019014691-197  
SG1019014691-198  
SG1019014691-199  
SG1019014691-200  
SG1019014691-201  
SG1019014691-202  
SG1019014691-203  
SG1019014691-204  
SG1019014691-205  
SG1019014691-206  
SG1019014691-207  
SG1019014691-208  
SG1019014691-209  
SG1019014691-210  
SG1019014691-211  
SG1019014691-212  
SG1019014691-213  
SG1019014691-214  
SG1019014691-215  
SG1019014691-216  
SG1019014691-217  
SG1019014691-218  
SG1019014691-219  
SG1019014691-220  
SG1019014691-221  
SG1019014691-222  
SG1019014691-223  
SG1019014691-224  
SG1019014691-225  
SG1019014691-226  
SG1019014691-227  
SG1019014691-228  
SG1019014691-229  
SG1019014691-230  
SG1019014691-231  
SG1019014691-232  
SG1019014691-233  
SG1019014691-234  
SG1019014691-235  
SG1019014691-236  
SG1019014691-237  
SG1019014691-238  
SG1019014691-239  
SG1019014691-240  
SG1019014691-241  
SG1019014691-242  
SG1019014691-243  
SG1019014691-244  
SG1019014691-245  
SG1019014691-246  
SG1019014691-247  
SG1019014691-248  
SG1019014691-249  
SG1019014691-250  
SG1019014691-251  
SG1019014691-252  
SG1019014691-253  
SG1019014691-254  
SG1019014691-255  
SG1019014691-256  
SG1019014691-257  
SG1019014691-258  
SG1019014691-259  
SG1019014691-260  
SG1019014691-261  
SG1019014691-262  
SG1019014691-263  
SG1019014691-264  
SG1019014691-265  
SG1019014691-266  
SG1019014691-267  
SG1019014691-268  
SG1019014691-269  
SG1019014691-270  
SG1019014691-271  
SG1019014691-272  
SG1019014691-273  
SG1019014691-274  
SG1019014691-275  
SG1019014691-276  
SG1019014691-277  
SG1019014691-278  
SG1019014691-279  
SG1019014691-280  
SG1019014691-281  
SG1019014691-282  
SG1019014691-283  
SG1019014691-284  
SG1019014691-285  
SG1019014691-286  
SG1019014691-287  
SG1019014691-288  
SG1019014691-289  
SG1019014691-290  
SG1019014691-291  
SG1019014691-292  
SG1019014691-293  
SG1019014691-294  
SG1019014691-295  
SG1019014691-296  
SG1019014691-297  
SG1019014691-298  
SG1019014691-299  
SG1019014691-300  
SG1019014691-301  
SG1019014691-302  
SG1019014691-303  
SG1019014691-304  
SG1019014691-305  
SG1019014691-306  
SG1019014691-307  
SG1019014691-308  
SG1019014691-309  
SG1019014691-310  
SG1019014691-311  
SG1019014691-312  
SG1019014691-313  
SG1019014691-314  
SG1019014691-315  
SG1019014691-316  
SG1019014691-317  
SG1019014691-318  
SG1019014691-319  
SG1019014691-320  
SG1019014691-321  
SG1019014691-322  
SG1019014691-323  
SG1019014691-324  
SG1019014691-325  
SG1019014691-326  
SG1019014691-327  
SG1019014691-328  
SG1019014691-329  
SG1019014691-330  
SG1019014691-331  
SG1019014691-332  
SG1019014691-333  
SG1019014691-334  
SG1019014691-335  
SG1019014691-336  
SG1019014691-337  
SG1019014691-338  
SG1019014691-339  
SG1019014691-340  
SG1019014691-341  
SG1019014691-342  
SG1019014691-343  
SG1019014691-344  
SG1019014691-345  
SG1019014691-346  
SG1019014691-347  
SG1019014691-348  
SG1019014691-349  
SG1019014691-350  
SG1019014691-351  
SG1019014691-352  
SG1019014691-353  
SG1019014691-354  
SG1019014691-355  
SG1019014691-356  
SG1019014691-357  
SG1019014691-358  
SG1019014691-359  
SG1019014691-360  
SG1019014691-361  
SG1019014691-362  
SG1019014691-363  
SG1019014691-364  
SG1019014691-365  
SG1019014691-366  
SG1019014691-367  
SG1019014691-368  
SG1019014691-369  
SG1019014691-370  
SG1019014691-371  
SG1019014691-372  
SG1019014691-373  
SG1019014691-374  
SG1019014691-375  
SG1019014691-376  
SG1019014691-377  
SG1019014691-378  
SG1019014691-379  
SG1019014691-380  
SG1019014691-381  
SG1019014691-382  
SG1019014691-383  
SG1019014691-384  
SG1019014691-385  
SG1019014691-386  
SG1019014691-387  
SG1019014691-388  
SG1019014691-389  
SG1019014691-390  
SG1019014691-391  
SG1019014691-392  
SG1019014691-393  
SG1019014691-394  
SG1019014691-395  
SG1019014691-396  
SG1019014691-397  
SG1019014691-398  
SG1019014691-399  
SG1019014691-400  
SG1019014691-401  
SG1019014691-402  
SG1019014691-403  
SG1019014691-404  
SG1019014691-405  
SG1019014691-406  
SG1019014691-407  
SG1019014691-408  
SG1019014691-409  
SG1019014691-410  
SG1019014691-411  
SG1019014691-412  
SG1019014691-413  
SG1019014691-414  
SG1019014691-415  
SG1019014691-416  
SG1019014691-417  
SG1019014691-418  
SG1019014691-419  
SG1019014691-420  
SG1019014691-421  
SG1019014691-422  
SG1019014691-423  
SG1019014691-424  
SG1019014691-425  
SG1019014691-426  
SG1019014691-427  
SG1019014691-428  
SG1019014691-429  
SG1019014691-430  
SG1019014691-431  
SG1019014691-432  
SG1019014691-433  
SG1019014691-434  
SG1019014691-435  
SG1019014691-436  
SG1019014691-437  
SG1019014691-438  
SG1019014691-439  
SG1019014691-440  
SG1019014691-441  
SG1019014691-442  
SG1019014691-443  
SG1019014691-444  
SG1019014691-445  
SG1019014691-446  
SG1019014691-447  
SG1019014691-448  
SG1019014691-449  
SG1019014691-450  
SG1019014691-451  
SG1019014691-452  
SG1019014691-453  
SG1019014691-454  
SG1019014691-455  
SG1019014691-456  
SG1019014691-457  
SG1019014691-458  
SG1019014691-459  
SG1019014691-460  
SG1019014691-461  
SG1019014691-462  
SG1019014691-463  
SG1019014691-464  
SG1019014691-465  
SG1019014691-466  
SG1019014691-467  
SG1019014691-468  
SG1019014691-469  
SG1019014691-470  
SG1019014691-471  
SG1019014691-472  
SG1019014691-473  
SG1019014691-474  
SG1019014691-475  
SG1019014691-476  
SG1019014691-477  
SG1019014691-478  
SG1019014691-479  
SG1019014691-480  
SG1019014691-481  
SG1019014691-482  
SG1019014691-483  
SG1019014691-484  
SG1019014691-485  
SG1019014691-486  
SG1019014691-487  
SG1019014691-488  
SG1019014691-489  
SG1019014691-490  
SG1019014691-491  
SG1019014691-492  
SG1019014691-493  
SG1019014691-494  
SG1019014691-495  
SG1019014691-496  
SG1019014691-497  
SG1019014691-498  
SG1019014691-499  
SG1019014691-500  
SG1019014691-501  
SG1019014691-502  
SG1019014691-503  
SG1019014691-504  
SG1019014691-505  
SG1019014691-506  
SG1019014691-507  
SG1019014691-508  
SG1019014691-509  
SG1019014691-510  
SG1019014691-511  
SG1019014691-512  
SG1019014691-513  
SG1019014691-514  
SG1019014691-515  
SG1019014691-516  
SG1019014691-517  
SG1019014691-518  
SG1019014691-519  
SG1019014691-520  
SG1019014691-521  
SG1019014691-522  
SG1019014691-523  
SG1019014691-524  
SG1019014691-525  
SG1019014691-526  
SG1019014691-527  
SG1019014691-528  
SG1019014691-529  
SG1019014691-530  
SG1019014691-531  
SG1019014691-532  
SG1019014691-533  
SG1019014691-534  
SG1019014691-535  
SG1019014691-536  
SG1019014691-537  
SG1019014691-538  
SG1019014691-539  
SG1019014691-540  
SG1019014691-541  
SG1019014691-542  
SG1019014691-543  
SG1019014691-544  
SG1019014691-545  
SG1019014691-546  
SG1019014691-547  
SG1019014691-548  
SG1019014691-549  
SG1019014691-550  
SG1019014691-551  
SG1019014691-552  
SG1019014691-553  
SG1019014691-554  
SG1019014691-555  
SG1019014691-556  
SG1019014691-557  
SG1019014691-558  
SG1019014691-559  
SG1019014691-560  
SG1019014691-561  
SG1019014691-562  
SG1019014691-563  
SG1019014691-564  
SG1019014691-565  
SG1019014691-566  
SG1019014691-567  
SG1019014691-568  
SG1019014691-569  
SG1019014691-570  
SG1019014691-571  
SG1019014691-572  
SG1019014691-573  
SG1019014691-574  
SG1019014691-575  
SG1019014691-576  
SG1019014691-577  
SG1019014691-578  
SG1019014691-579  
SG1019014691-580  
SG1019014691-581  
SG1019014691-582  
SG1019014691-583  
SG1019014691-584  
SG1019014691-585  
SG1019014691-586  
SG1019014691-587  
SG1019014691-588  
SG1019014691-589  
SG1019014691-590  
SG

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**MUTEÍ-NAS DE LIPOCALINA COM AFINIDADE DE LIGAÇÃO PARA LAG-3**”.

**I. ANTECEDENTES**

[0001] Gene de Ativação de Linfócitos 3, ou LAG-3 (também conhecido como Conjunto de Diferenciação 223 ou CD223), é uma proteína de membrana da família de supergenes de imunoglobulina. LAG-3 é estruturalmente e geneticamente relacionado a CD4, com seu gene de codificação localizado na parte distal do braço curto do cromossomo 12, próximo ao gene CD4, o que sugere que o gene LAG-3 pode ter evoluído através da duplicação de gene (Triebel *et al.*, *J Exp Med*, 1990). LAG-3 não é expresso sobre linfócitos do sangue periférico em repouso, mas é expresso sobre células T ativadas e células matadoras naturais (NK) (Triebel *et al.*, *J Exp Med*, 1990) e relatou-se que ele também é expresso sobre células B ativadas (Kisielow *et al.*, *Eur J Immunol*, 2005) e células dendríticas plasmacitoides (Workman *et al.*, *J Immunol*, 2009).

[0002] Como CD4, LAG-3 se liga a moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) da classe II, mas com uma afinidade mais alta e em um local de ligação diferente (Huard *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997). O engate de MHC da classe II nas células dendríticas por LAG-3 leva a mudanças nos perfis de citocina e quimiocina de células dendríticas (Buisson e Triebel, *Vaccine*, 2003). Além disso, relatou-se que LAG-3 causa maturação de células dendríticas, conforme demonstrado pela produção de IL-12 e TNF-alfa por essas células e aumentos da capacidade de células dendríticas para estimular a proliferação e a reação de IFN-gama por células T alógenicas (Andreae *et al.*, *J Immunol*, 2002). A sinalização de LAG-3 e reticulação de MHC da classe II foi relatada como inibidora dos eventos iniciais em ativação primária de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> humanas (Macon-Lemaître e Triebel, *Immunology*, 2005). A mesma regula negativamente a proliferação celular, ativação e homeostase de células T.

[0003] Como CTLA-4 e PD-1, LAG-3 é um receptor imune inibidor.

O papel proeminente de LAG-3 como regulador negativo de reações de células T foi surpreendentemente demonstrado, particularmente em conjunto com PD-1 em um estudo com base em camundongos nulos e anticorpos específicos de alvo (Woo *et al.*, Cancer Res, 2012). Neste estudo, o tratamento com anticorpo anti-LAG-3/anti-PD-1 duplo curou a maior parte dos camundongos com tumores estabelecidos que eram, em grande parte, resistentes ao tratamento com anticorpos isolados. Além disso, camundongos nulos duplos LAG-3/PD-1 demonstraram sobrevivência marcadamente mais alta e liberação de diversos tumores transplantáveis. Foi fornecido forte suporte experimental adicional para o poderoso papel combinado de PD-1 e LAG-3 como verificadores imunes, pois os camundongos nulos duplos eram altamente propensos a autoinflamação letal.

[0004] Consequentemente, existe uma necessidade não atendida na técnica de compostos que modulem reações de linfócitos LAG-3+, tais como células T, células NK, células B e células dendríticas plasmacitoides, que podem ter importantes usos no tratamento ou prevenção de câncer, rejeição de transplantes de órgãos ou tratamento de doenças autoimunes ou autoinflamatórias. É adicionalmente desejável ter miteínas de lipocalina que têm capacidade para ligar LAG-3 com alta afinidade, que têm bioestabilidade intensificada e que podem ser usadas em aplicações farmacêuticas e/ou diagnósticas. Em relação a isso, é um objetivo da presente descrição fornecer tais miteínas de lipocalina. Nenhuma tal miteína de lipocalina que tem estas altas afinidades de ligação e recursos de bioestabilidade intensificados foi anteriormente descrita.

[0005] Além disso, foi considerado como natural que o metabolismo de macaco seja o mais similar àquele de seres humanos, e, consequentemente, os macacos cinomolgos foram amplamente usados em estudos

farmacocinéticos ou de segurança de fármaco no desenvolvimento de novas terapias, incluindo novos produtos biológicos. Tais estudos podem ser adicionalmente pré-requisitos necessários para aprovação reguladora. Desse modo, também é desejável ter muteínas de lipocalina que são reativas de modo cruzado tanto com LAG-3 humano ou cinomolgo, com padrão de ligação comparável, incluindo afinidade de ligação comparável ou similar. Nenhuma tal muteína de lipocalina que tem estes recursos de reatividade cruzada foi anteriormente descrita.

[0006] A recitação de qualquer referência neste pedido não é uma admissão que a referência é técnica anterior deste pedido.

[0007] Com relação a isso, a presente descrição fornece um grupo de compostos inovadores que se ligam especificamente ao LAG-3 tanto de seres humanos quanto de macacos cinomolgos com alta afinidade e com recursos de bioestabilidade intensificada, modulando assim a resposta imune. Tais compostos são muteínas derivadas de lipocalinas e podem ser usadas em aplicações farmacêuticas, diagnósticas ou outras aplicações. As muteínas de lipocalinas são uma classe de rápida expansão de produtos terapêuticos e podem ser construídas para exibir alta afinidade e especificidade com alvos desejáveis (consultar, por exemplo, Publicações de Patente Internacional n.º WO 99/16873, WO 00/75398, WO 03/029471 e WO 05/19256).

## **II. DEFINIÇÕES**

[0008] A relação a seguir define termos, frases e abreviações utilizados em todo o presente relatório descritivo. Todos os termos mencionados e definidos no presente documento destinam-se a englobar todas as formas gramaticais.

[0009] Conforme utilizado no presente documento, a menos que especificado em contrário, "LAG-3" indica LAG-3 humano (huLAG-3) e inclui variantes, isoformas e espécies homólogas de LAG-3 humano. LAG-3 também é conhecido como "gene de ativação de linfócitos 3", "conjunto de

diferenciação 223" ou "CD223", que são utilizados de forma intercambiável. LAG-3 humano significa uma proteína com comprimento total definida por meio de UniProt P18627 (versão 5 de 7 de julho de 2009), um de seus fragmentos ou uma de suas variantes. LAG-3 de cinomolgo (cyLAG-3) refere-se ao LAG-3 de macacos cinomolgos. CyLAG-3 também pode ser usado para se referir ao domínio extracelular de cyLAG-3 conforme apresentado na posição 1 a 428 da SEQ ID NO: 56.

[0010] Conforme utilizado no presente documento, "afinidade detectável" significa a capacidade de se ligar a um alvo selecionado com uma afinidade, geralmente medida por  $K_d$  ou  $EC_{50}$ , de, no máximo, cerca de  $10^{-5}$  M ou menos (valor  $K_d$  ou  $EC_{50}$  mais baixo reflete melhor atividade de ligação). Afinidades mais baixas geralmente não são mais mensuráveis com métodos comuns tais como ELISA (teste imunossorvente ligado por enzimas) e, portanto, são de importância secundária.

[0011] Conforme usado no presente documento, "afinidade de ligação" de uma proteína da descrição (por exemplo, uma muteína de uma lipocalina) ou um polipeptídeo de fusão do mesmo para um alvo selecionado (no presente caso, LAG-3), pode ser medida (e assim valores de  $K_d$  de um complexo de ligante de muteína pode ser determinado) por uma multiplicidade de métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Esses métodos incluem, mas sem limitações, titulação por fluorescência, ELISA competitivo, métodos calorimétricos, tais como calorimetria por titulação isotérmica (TIC), e ressonância de plasmon de superfície (SPR). Esses métodos são bem estabelecidos na técnica e seus exemplos também são detalhados abaixo.

[0012] Também se observou que a formação de complexo entre o aglutinante correspondente e seu ligante é influenciada por muitos fatores diferentes, tais como as concentrações dos parceiros de ligação correspondentes, a presença de correntes, o pH e a resistência iônica do sistema tampão utilizado, bem como o método experimental utilizado

para determinação da constante de dissociação  $K_d$  (por exemplo, titulação de fluorescência, ELISA de competição ou ressonância de plasmon de superfície, apenas para mencionar alguns), ou mesmo o algoritmo matemático que é utilizado para avaliação dos dados experimentais.

[0013] Também fica claro para os técnicos no assunto, portanto, que os valores  $K_d$  (constante de dissociação do complexo formado entre o aglutinante correspondente e seu alvo/ligante) podem variar em uma certa faixa experimental, dependendo do método e da configuração experimental utilizados para determinar a afinidade de uma muteína de lipocalina específica para um dado ligante. Isso significa que pode haver um leve desvio dos valores  $K_d$  medidos ou uma faixa de tolerância dependendo, por exemplo, se o valor  $K_d$  foi determinado por meio de ressonância de plasmon de superfície (SPR), por ELISA competitivo ou por ELISA direto.

[0014] Conforme utilizado no presente documento, uma "muteína", uma entidade "que sofreu mutação" (seja proteína ou ácido nucleico) ou "mutante" refere-se à substituição, deleção ou inserção de um ou mais nucleotídeos ou aminoácidos, em comparação com o ácido nucleico de ocorrência natural (do tipo selvagem) ou estrutura "de referência" de proteína. O mencionado termo também inclui fragmentos de uma muteína e variantes conforme descrito no presente documento. Muteínas de lipocalina de acordo com a presente invenção, seus fragmentos ou variantes preferencialmente possuem a função de ligação a LAG-3, conforme descrito no presente documento.

[0015] O termo "fragmento" conforme usado no presente documento em conexão com as muteínas da descrição se refere a proteínas ou peptídeos derivados de lipocalina de lágrima humana madura de comprimento completo (hTlc ou hTLPc) que é encurtada de modo N-terminal e/ou de modo C-terminal, isto é, que não tem pelo menos um dos aminoácidos N-terminais e/ou C-terminais. Esse fragmento pode

não conter até 2, até 3, até 4, até 5, até 10, até 15, até 20, até 25 ou até 30 (incluindo todos os números entre eles) aminoácidos N-terminais e/ou C-terminais. Como exemplo ilustrativo, esse fragmento pode não conter quatro aminoácidos N-terminais e dois aminoácidos C-terminais. É entendido que o fragmento é preferencialmente um fragmento funcional da lipocalina de lágrima de comprimento completo (muteína), o que significa que o mesmo comprehende preferencialmente o bolso de ligação da lipocalina de lágrima de comprimento completo (muteína) do qual é derivado. Como exemplo ilustrativo, tal fragmento funcional pode comprehendre pelo menos os aminoácidos 5 a 156 da sequência de polipeptídeo linear de lipocalina de lágrima humana madura nativa. Tais fragmentos podem incluir pelo menos 10, mais, como 20 ou 30 ou mais aminoácidos consecutivos da sequência primária de lipocalina de lágrima madura e são usualmente detectáveis em um imunoensaio da lipocalina madura.

[0016] De forma geral, o termo "fragmento", conforme usado no presente documento em relação ao LAG-3 de ligante de proteína correspondente de uma muteína de lipocalina da descrição ou da combinação de acordo com a descrição ou de uma proteína de fusão descrita no presente documento, se refere a ligantes de peptídeo ou proteína encurtados de modo N-terminal e/ou de modo C-terminal, os quais retêm a capacidade do ligante de comprimento completo a ser reconhecido e/ou ligado por uma muteína de acordo com a descrição.

[0017] O termo "mutagênese", conforme utilizado no presente documento, significa que as condições experimentais são selecionadas de tal forma que o aminoácido de ocorrência natural em uma dada posição de sequência da lipocalina madura possa ser substituído por pelo menos um aminoácido que não está presente nessa posição específica na sequência de polipeptídeo natural correspondente. O termo "mutagênese" também inclui a modificação (adicional) do comprimento de segmentos de sequências

por meio de deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos. Encontra-se, portanto, dentro do escopo da presente invenção que, por exemplo, um aminoácido em uma posição de sequência selecionada seja substituído por um conjunto de três mutações aleatórias, gerando inserção de dois resíduos de aminoácidos em comparação com o comprimento do segmento correspondente da proteína do tipo selvagem. Essa inserção ou deleção pode ser introduzida independentemente entre si em qualquer dos segmentos de peptídeos que podem ser submetidos a mutagênese na presente invenção. Em um exemplo de modalidade da presente invenção, pode-se introduzir uma inserção de diversas mutações no circuito AB da estrutura de lipocalina selecionada (cf. Patente Internacional Publicada n.º WO 2005/019256, que é integralmente incorporada ao presente documento como referência).

[0018] A expressão "mutagênese aleatória" indica que nenhum aminoácido isolado previamente determinado (mutação) está presente em uma certa posição de sequência, mas que pelo menos dois aminoácidos podem ser incorporados com certa probabilidade em uma posição de sequência previamente definida durante a mutagênese.

[0019] "Identidade" é uma propriedade de sequências que mede sua similaridade ou relacionamento. A expressão "identidade de sequências" ou "identidade", conforme utilizada na presente invenção, indica o percentual de resíduos idênticos em pares (após o alinhamento [homólogo] de uma sequência de polipeptídeo de acordo com a presente descrição com uma sequência em questão) com relação à quantidade de resíduos na mais longa dessas duas sequências. A identidade de sequências é medida dividindo-se o número de resíduos de aminoácidos idênticos pelo número total de resíduos e multiplicando-se o produto por 100.

[0020] O termo "homologia" é utilizado no presente documento no seu significado habitual e inclui aminoácidos idênticos, bem como aminoácidos

que são considerados substituições conservadoras (por exemplo, substituição de um resíduo de glutamato por um resíduo de aspartato) em posições equivalentes na sequência de aminoácidos linear de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção (por exemplo, quaisquer muteínas de lipocalina de acordo com a descrição).

[0021] O percentual de homologia de sequências ou identidade de sequências pode ser determinado no presente documento, por exemplo, utilizando o programa BLASTP, versão blastp 2.2.5 (16 de novembro de 2002) (cf. Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res, 1997). Nessa modalidade, a porcentagem de homologia tem base no alinhamento da sequência de polipeptídeo inteira (matriz: BLOSUM 62; custos de lacuna: 11,1; valor de corte definido a  $10^{-3}$ ) incluindo as sequências de propeptídeo, preferencialmente com o uso da estrutura de proteína do tipo de selvagem como referência em uma comparação em pares. Ele é calculado como o percentual de números de "positivos" (aminoácidos homólogos) indicados como resultado no programa BLASTP, dividido pelo número total de aminoácidos selecionados pelo programa para o alinhamento.

[0022] Especificamente, a fim de determinar se um resíduo de aminoácido da sequência de aminoácidos de uma lipocalina (muteína) é diferente de uma lipocalina do tipo selvagem correspondente a uma certa posição na sequência de aminoácidos de uma lipocalina do tipo selvagem, os técnicos na área podem utilizar meios e métodos bem conhecidos na técnica, tais como alinhamentos, seja manualmente ou utilizando programas de computador tais como BLAST 2.0, que significa Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico, ou ClustalW, ou qualquer outro programa apropriado que seja adequado para gerar alinhamentos de sequências. Consequentemente, uma sequência do tipo selvagem de lipocalina pode servir como "sequência objeto" ou "sequência de referência", enquanto a sequência de aminoácidos de uma

lipocalina diferente da lipocalina do tipo selvagem descrita no presente documento serve como "sequência de consulta." As expressões "sequência do tipo selvagem", "sequência de referência" e "sequência objeto" são utilizadas de forma intercambiável no presente documento. Uma sequência do tipo selvagem preferencial de lipocalina é a sequência de hTlc conforme mostrado na SEQ ID NO: 1.

[0023] "Intervalos" são espaços em um alinhamento que são resultado de adições ou deleções de aminoácidos. Duas cópias exatamente da mesma sequência possuem, portanto, 100% de identidade, mas sequências com menor conservação e que possuem deleções, adições ou substituições podem ter grau mais baixo de identidade de sequências. Os técnicos na área reconhecerão que diversos programas de computador estão disponíveis para determinar a identidade de sequências utilizando parâmetros padrão, tais como BLAST (Altschul, et al. (1997), *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402), Blast2 (Altschul, et al. (1990), *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410) e Smith-Waterman (Smith, et al. (1981), *J. Mol. Biol.* **147**, 195-197).

[0024] O termo "variante", conforme utilizado na presente descrição, relaciona-se com derivados de proteína ou peptídeo que incluem modificações da sequência de aminoácidos, por exemplo, por meio de substituição, deleção, inserção ou modificação química. Essas modificações, em algumas modalidades, não reduzem a funcionalidade da proteína ou peptídeo. Essas variantes incluem proteínas, em que um ou mais aminoácidos foram substituídos pelos seus D-estereoisômeros correspondentes ou por aminoácidos diferentes dos vinte aminoácidos de ocorrência natural, tais como, por exemplo, ornitina, hidroxiprolina, citrulina, homosserina, hidroxilisina e norvalina. Essas substituições, entretanto, podem também ser conservadoras, ou seja, um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido quimicamente similar. Os exemplos de substituições conservativas são as substituições entre os

membros dos grupos a seguir: 1) alanina, serina e treonina; 2) ácido aspártico e ácido glutâmico; 3) asparagina e glutamina; 4) arginina e lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina e valina; e 6) fenilalanina, tirosina e triptofano. O termo "variante", conforme usado no presente documento em relação ao LAG-3 alvo de proteína correspondente de uma mureína de lipocalina da descrição ou de uma combinação e/ou uma proteína de fusão de acordo com a descrição, se refere a LAG-3 ou fragmento do mesmo, que tem um ou mais, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou mais substituições, deleções e/ou inserções de aminoácido em comparação com uma proteína de LAG-3 do tipo selvagem, como uma proteína de referência de LAG-3 conforme depositado com UniProt conforme descrito no presente documento. Uma variante de LAG-3 tem preferencialmente uma identidade de aminoácido de pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% ou 95% com um LAG-3 do tipo selvagem, como uma proteína de referência de LAG-3 humano conforme depositado com UniProt, conforme descrito no presente documento.

[0025] Por uma "sequência nativa" de lipocalina, entende-se que a sequência de lipocalina que possui a mesma sequência de aminoácidos do polipeptídeo correspondente derivado da natureza. Desse modo, uma lipocalina de sequência nativa pode ter a sequência de aminoácidos da respectiva lipocalina de ocorrência natural a partir de qualquer organismo, em particular, um mamífero. Esse polipeptídeo de sequência nativa pode ser isolado da natureza ou pode ser produzido por meios sintéticos ou recombinantes. A expressão polipeptídeo de "sequência nativa" engloba especificamente formas secretadas ou truncadas de ocorrência natural da lipocalina, formas variantes de ocorrência natural, tais como formas alternativamente divididas e variantes alélicas de ocorrência natural da lipocalina. "Variante" de polipeptídeo indica um polipeptídeo biologicamente ativo que possui pelo menos cerca de 50%,

60%, 70%, 80% ou pelo menos cerca de 85% de identidade de sequências de aminoácidos com o polipeptídeo de sequência nativa. Tais variantes incluem, por exemplo, polipeptídeos em que um ou mais resíduos de aminoácido são adicionados ou deletados na terminação N ou C do polipeptídeo. Geralmente, uma variante possui pelo menos cerca de 70%, incluindo pelo menos cerca de 80%, tal como pelo menos cerca de 85% de identidade de sequências de aminoácidos, incluindo pelo menos cerca de 90% de identidade de sequências de aminoácidos ou pelo menos cerca de 95% de identidade de sequências de aminoácidos com o polipeptídeo de sequência nativa. Como um exemplo ilustrativo, os primeiros 4 resíduos de aminoácido N-terminal (His-His-Leu-Leu, SEQ ID NO: 51) e os últimos 2 resíduos de aminoácido C-terminais (Ser-Asp) podem ser deletados ou sofrer mutação em uma mureína de hTlc da descrição sem afetar a função biológica da proteína, por exemplo, SEQ ID NOs: 7 a 28, 57 a 70 e 85 a 95.

[0026] O termo "posição", quando utilizado de acordo com a presente invenção, significa a posição de um aminoácido em uma sequência de aminoácidos ilustrada no presente documento ou a posição de um nucleotídeo em uma sequência de ácidos nucleicos ilustrada no presente documento. Para compreender o termo "corresponde" ou "correspondente", conforme utilizado no presente documento, no contexto das posições de sequências de aminoácidos de uma ou mais mureínas de lipocalina, a posição correspondente não é apenas determinada pela quantidade dos nucleotídeos/aminoácidos anteriores. Consequentemente, a posição de um dado aminoácido de acordo com a descrição que pode ser substituído pode variar devido à deleção ou adição de aminoácidos em outro ponto em uma lipocalina (mutante ou do tipo selvagem). De forma similar, a posição de um dado nucleotídeo de acordo com a presente descrição que pode ser substituído pode variar devido a deleções ou nucleotídeos adicionais em outro ponto de uma região

não traduzida 5' (UTR) de lipocalina do tipo selvagem ou muteína, incluindo as sequências promotoras e/ou quaisquer outras reguladoras ou gene (incluindo exons e introns).

[0027] Desse modo, para uma "posição correspondente" de acordo com a descrição, é preferencialmente para ser entendido que as posições de nucleotídeos/aminoácidos podem diferir no número indicado em relação a nucleotídeos/aminoácidos adjacentes similares, mas os ditos nucleotídeos/aminoácidos adjacentes, os quais podem ser trocados, deletados, ou adicionados, também são compreendidos pelas uma ou mais "posições correspondentes".

[0028] Além disso, para uma posição correspondente em uma muteína de lipocalina com base em uma sequência de referência de acordo com a descrição, compreende-se preferencialmente que as posições de nucleotídeos/aminoácidos correspondem estruturalmente às posições em outros locais em uma lipocalina (mutante ou do tipo selvagem), mesmo se elas puderem diferir no número indicado, conforme apreciado pelos técnicos na área à luz do padrão de dobra geral altamente conservado entre as lipocalinas.

[0029] O termo "albumina" inclui todas as albuminas de mamíferos, tais como albumina de soro humano, albumina de soro bovino ou albumina de soro de rato.

[0030] O termo "molécula orgânica" ou "molécula orgânica pequena" conforme usado no presente documento para o alvo não natural denota uma molécula orgânica que compreende pelo menos dois átomos de carbono, mas preferencialmente no máximo 7 ou 12 ligações de carbono giratórias, que têm um peso molecular na faixa entre 100 e 2.000 Dáltons, preferencialmente entre 100 e 1.000 Dáltons, e incluindo opcionalmente um ou dois átomos de metal.

[0031] A palavra "detectar", "detecção", "detectável", ou "que detecta", conforme usado no presente documento, é entendida tanto em

um nível quantitativo quanto qualitativo, assim como uma combinação das mesmas. A mesma inclui, desse modo, medições quantitativas, semi-quantitativas e qualitativas de uma molécula de interesse.

[0032] "Paciente" é um vertebrado, preferencialmente um mamífero e, de maior preferência, um ser humano. O termo "mamífero" é usado no presente documento para se referir a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo, sem limitação, seres humanos, animais domésticos e de fazenda e animais de zoológico, de esportes, ou de estimação, como carneiros, cães, cavalos, gatos, vacas, ratos, porcos, símios, como macacos cinomolgos, sendo estes, apenas alguns exemplos ilustrativos. Preferencialmente, o "mamífero" no presente documento é ser humano.

[0033] "Quantidade eficaz" é uma quantidade suficiente para obter resultados benéficos ou desejados. Pode-se administrar uma quantidade eficaz em uma ou mais administrações.

[0034] "Amostra" é definida como amostra biológica retirada de qualquer paciente. Amostras biológicas incluem, mas sem limitações, sangue, soro, urina, fezes, sêmen ou tecidos.

### **III. DESCRIÇÕES DAS FIGURAS**

[0035] **Figura 1:** representa um alinhamento de sequências de aminoácidos de muteínas de lipocalina de lágrima humana (hTlc) específicas de LAG-3 otimizadas, em comparação com a sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura. Em comparação com a sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1), os primeiros 4 resíduos de aminoácido N-terminal (His, His, Leu, Leu; SEQ ID NO: 50) e os últimos 2 resíduos de aminoácido C-terminal (Ser, Asp) são deletados nessas muteínas de ligação de LAG-3 derivadas de hTlc (listadas como muteínas de hTlc de SEQ ID NOs: 7 a 28 e 57 a 70) e as muteínas de controle negativo (SEQ ID NOs: 3 e 4).

[0036] **Figura 2:** representa os resultados dos estudos de separação de células ativadas por fluorescência (FACS) executados a fim de avaliar a ligação específica das muteínas de lipocalina a LAG-3 humano (**Figura 2A**) e LAG-3 cinomolgo (**Figura 2B**), respectivamente, expressos em células de mamífero conforme descrito no **Exemplo 5**. As células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas de modo estável com LAG-3 humano ou cinomolgo foram incubadas com muteínas de lipocalina, e as muteínas ligadas foram detectadas com o uso de um anticorpo anti-hTlc marcado de modo fluorescente. Todas as muteínas de lipocalina mostram ligação a LAG-3 expresso em células de CHO com EC<sub>50</sub> comparável ao anticorpo de bancada testado (SEQ ID NOs: 5 e 6). A muteína de lipocalina negativa SEQ ID NO: 3 e a IgG4 humana de controle negativo (hIgG4) (SEQ ID NOs: 55 e 56, Sigma n.º 14639) não mostraram ligação. A média geométrica da intensidade de fluorescência foi normalizada para a média máxima e ajustada com um modelo de ligação 1:1. Os valores de EC<sub>50</sub> resultantes são fornecidos na **Tabela 3**.

[0037] **Figura 3:** mostra que muteínas de lipocalina competem com moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) da classe II (ligantes naturais de LAG-3) para a ligação a LAG-3 em um experimento de FACS competitivo. A linhagem celular humana positiva de MHC da classe II A375 foi incubada com muteína de lipocalina e huLAG-3-Fc (domínio extracelular LAG-3 humano fundido ao fragmento Fc de IgG1 humana, R&D systems), o huLAG-3-Fc ligado foi detectado com o uso de um anticorpo de IgG anti-humana de cabra conjugado com ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., n.º 109-1 16-098). Uma inibição dependente de dose de huLAG-3-Fc que se liga a moléculas de MHC da classe II por muteínas de lipocalina específicas de LAG-3 foi mostrada. As muteínas de lipocalina específicas de LAG-3 e a molécula de referência (SEQ ID NOs: 5 e 6) mostraram efeito inibidor na ligação de LAG-3/MHC da classe II em concentrações iguais.

A muteína de lipocalina de controle negativo (SEQ ID NO: 3) e o controle negativo de hIgG4 não levaram à inibição mensurável de ligação de hu-LAG-3-Fc a células A375 que expressam moléculas de MHC da classe II.

#### **IV. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[0038] Conforme utilizado no presente documento, "lipocalina" é definida como proteína monomérica com peso de cerca de 18-20 kDa, que possui uma região estrutural supersecundária de folha pregueada  $\beta$  cilíndrica que compreende uma série de (preferencialmente oito) fitas  $\beta$  conectadas em pares por uma série de (preferencialmente quatro) circuitos em uma extremidade, de forma a definir um bolso de ligação. É a diversidade dos circuitos na estrutura de lipocalina que, de outra forma, é rígida que gera uma série de modos de ligação diferentes entre os membros da família de lipocalina, cada qual capaz de acomodar alvos com tamanho, formato e características químicas diferentes (analizados, por exemplo, em Skerra, *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower, *Biochem J*, 1996). De fato, a família de lipocalina de proteínas evoluiu naturalmente para ligar um amplo espectro de ligantes, que compartilham níveis incomumente baixos de conservação de sequências geral (frequentemente com identidades de sequências de menos de 20%), retendo ainda padrão de dobra geral altamente conservado. A correspondência entre as posições em várias lipocalinas é bem conhecida por um versado na técnica (consultar, por exemplo, Patente n.º U.S. 7.250.297).

[0039] Conforme indicado acima, uma lipocalina é um polipeptídeo definido pela sua estrutura supersecundária, nomeadamente uma região estrutural supersecundária de folha pregueada  $\beta$  cilíndrica que compreende oito fitas  $\beta$  conectadas em pares por quatro circuitos em uma extremidade, de forma a definir assim um bolso de ligação. A presente descrição não se limita a muteínas de lipocalina especificamente

descritas no presente. Com relação a isso, a descrição se refere a muteínas de lipocalina que têm uma região estrutural supersecundária de folha pregueada  $\beta$  cilíndrica que compreende oito fitas  $\beta$  conectadas em pares por quatro circuitos em uma extremidade, de forma a definir assim um bolso de ligação, em que pelo menos um aminoácido de cada um dos pelo menos três dentre os ditos quatro circuitos sofreu mutação em comparação com a sequência de referência, e em que a dita lipocalina é eficaz para se ligar a LAG-3 com afinidade detectável.

[0040] Em uma modalidade específica, muteína de lipocalina descrita no presente documento é uma muteína de lipocalina de lágrima humana (hTlc ou hTLPc), também denominada lipocalina 1, pré-albumina de lágrima humana ou proteína glandular de von Ebner. A expressão "lipocalina de lágrima humana, "hTlc" ou "lipocalina 1", da forma utilizada no presente, designa a lipocalina de lágrima humana madura com o Número de Acesso de Banco de Dados SWISS-PROT/UniProt P31025 (Isoforma 1). A sequência de aminoácidos mostrada no Número de Acesso de Banco de Dados SWISS-PROT/UniProt P31025 pode ser usada como uma "sequência de referência" preferencial, mas preferencialmente a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1 é usada no presente documento como "sequência de referência".

[0041] Em algumas modalidades, LAG-3 de ligação de muteína de lipocalina com afinidade detectável pode incluir pelo menos uma substituição de aminoácidos de um resíduo de cisteína nativa da sequência de referência por outro aminoácido, tal como um resíduo de serina. Em algumas outras modalidades, LAG-3 de ligação de muteína de lipocalina com afinidade detectável pode incluir um ou mais resíduos de cisteína não nativos que substituem um ou mais aminoácidos de uma lipocalina do tipo selvagem. Em uma modalidade específica adicional, muteína de lipocalina de acordo com a descrição inclui pelo menos duas substituições de aminoácidos de um aminoácido nativo por um resíduo de cisteína, de maneira a

formar uma ou mais pontes de cisteína. Em algumas modalidades, a mencionada ponte de cisteína pode conectar pelo menos duas regiões de circuito. A definição dessas regiões é utilizada no presente documento de acordo com Flower (Biochem. J., 1996) (Biochem Biophys Acta, 2000) e Breustedt *et al.* (J Biol Chem, 2005). Em uma modalidade relacionada, a descrição ensina uma ou mais mutações de lipocalina que são capazes de ativar vias de sinalização posteriores de LAG-3 por meio de ligação a LAG-3.

[0042] As proteínas da descrição, que são dirigidas contra LAG-3 ou são específicas para ele, incluem qualquer quantidade de mutações de proteínas de ligação específicas que são baseadas em uma estrutura de proteína definida, preferencialmente uma estrutura de lipocalina. Também preferencialmente, a quantidade de nucleotídeos ou aminoácidos, respectivamente, que são trocados, deletados ou inseridos é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais, como 25, 30, 35, 40, 45 ou 50, com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou 11 sendo preferenciais e 9, 10 ou 11 sendo ainda mais preferenciais. Prefere-se, entretanto, que mutações de proteína da descrição ainda sejam capazes de ligar LAG-3.

[0043] Em um aspecto, a presente descrição inclui diversas mutações de lipocalina que ligam LAG-3 com afinidade pelo menos detectável. Nesse sentido, LAG-3 pode ser considerado como um ligante não natural de lipocalinas do tipo selvagem, em que o "ligante não natural" se refere a um composto que não se liga a lipocalina do tipo selvagem sob condições fisiológicas. Projetando-se lipocalina do tipo selvagem com uma ou mais mutações em certas posições de sequência, os presentes inventores demonstraram que alta afinidade e alta especificidade para o ligante não natural, LAG-3, é possível. Em algumas modalidades, em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou até mais tripletos de nucleotídeo que codificam certas posições de sequência em lipocalinas do tipo selvagem, a mutagênese aleatória

pode ser executada através da substituição nestas posições por um subconjunto de tripletos de nucleotídeo.

[0044] Adicionalmente, as mutações de lipocalina da descrição podem ter um resíduo de aminoácido que sofreu mutação em quaisquer uma ou mais, incluindo pelo menos em quaisquer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou mais das posições de sequência correspondentes a certas posições de sequência da sequência de polipeptídeo linear da lipocalina de referência.

[0045] Uma proteína da descrição pode incluir a sequência de aminoácidos do tipo selvagem (natural) da estrutura de proteína "parental" (tal como uma estrutura de lipocalina) fora das posições de sequências de aminoácidos que sofreram mutação. Em algumas modalidades, mutação de lipocalina de acordo com a descrição pode também conduzir uma ou mais mutações de aminoácidos em uma ou mais posições de sequências, desde que essa mutação, pelo menos essencialmente, não prejudique ou não interfira com a atividade de ligação e a dobra da mutação. Tais mutações podem ser alcançadas muito facilmente no nível de DNA com o uso de métodos padrão estabelecidos (Sambrook e Russell, 2001, Molecular cloning: a laboratory manual). Exemplos ilustrativos de alterações da sequência de aminoácidos são inserções ou deleções, bem como substituições de aminoácidos. Tais substituições podem ser conservativas, isto é, um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido de propriedades quimicamente similares, em particular, em relação à polaridade, assim como tamanho. Os exemplos de substituições conservativas são as substituições entre os membros dos grupos a seguir: 1) alanina, serina e treonina; 2) ácido aspártico e ácido glutâmico; 3) asparagina e glutamina; 4) arginina e lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina e valina; e 6) fenilalanina, tirosina e triptofano. Por outro lado, também é possível introduzir alterações não conservadoras na sequência de aminoácidos. Além disso, em vez de substituir resíduos de

aminoácidos isolados, também é possível inserir ou deletar um ou mais aminoácidos contínuos da estrutura primária da lipocalina de referência, preferencialmente como hTlc, desde que essas deleções ou inserções resultem em uma mutoína funcional, dobrada e estável. Em tal mutoína, por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácido são adicionados ou deletados na terminação N ou C do polipeptídeo (por exemplo, mutoínas de hTlc com terminação N e C). Em geral, tal mutoína pode ter cerca de pelo menos 70%, incluindo pelo menos cerca de 80%, como pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de aminoácidos, com a sequência de aminoácidos de hTlc (SEQ ID NO: 1). Como exemplo ilustrativo, a presente descrição também abrange mutoínas de hTlc, conforme definido acima, em que os primeiros quatro resíduos de aminoácido N-terminais da sequência de lipocalina de lágrima humana madura (His-His-Leu-Leu; SEQ ID NO: 51; posições 1 a 4) e/ou os últimos dois resíduos de aminoácido C-terminais (Ser-Asp; posições 157 a 158) da sequência de polipeptídeo linear da lipocalina de lágrima humana madura foram deletados (consultar, por exemplo, SEQ ID Nos: 7 a 28, 57 a 70 e 85 a 95).

[0046] A sequência de aminoácidos de uma mutoína de lipocalina divulgada no presente documento possui alta identidade de sequência para a lipocalina de referência, preferencialmente hTlc, em comparação com identidades de sequências com outras lipocalinas. Neste contexto geral, a sequência de aminoácidos de uma mutoína de lipocalina da descrição é ao menos substancialmente similar à sequência de aminoácidos da lipocalina de referência, com a ressalva de que possivelmente haja intervalos (conforme definido abaixo) em um alinhamento, que são o resultado de adições ou deleções de aminoácidos. Uma sequência correspondente de uma mutoína de lipocalina da descrição, que é substancialmente similar às sequências da lipocalina de referência, possui, em algumas modalidades, pelo menos 70% de identidade ou homologia

de sequências, pelo menos 75% de identidade ou homologia de sequências, pelo menos 80% de identidade ou homologia de sequências, pelo menos 82% de identidade ou homologia de sequências, pelo menos 85% de identidade ou homologia de sequências, pelo menos 87% de identidade ou homologia de sequências ou pelo menos 90% de identidade ou homologia de sequências, incluindo pelo menos 95% de identidade ou homologia de sequências, para a sequência da lipocalina de referência, com a ressalva de que a sequência ou posição alterada é retida e são possíveis um ou mais intervalos.

[0047] Conforme utilizado no presente documento, muteína de lipocalina da descrição "liga especificamente" um alvo (por exemplo, LAG-3) se for capaz de discriminar entre aquele alvo e um ou mais alvos de referência, pois a especificidade de ligação não é propriedade absoluta, mas sim relativa. "Ligação específica" pode ser determinada, por exemplo, de acordo com western blots, ELISA, FACS, RIA (radioimunoensaio), ECL (eletroquimioluminescência), IRMA (ensaio imunorradiométrico), IHC (imuno-histoquímica) e varreduras de peptídeo.

[0048] Em uma modalidade, as muteínas de lipocalina da descrição são fundidas no seu terminal N e/ou no seu terminal C a um parceiro de fusão, que é um domínio de proteína que prolonga a meia vida em soro da muteína. Em modalidades específicas adicionais, o domínio de proteína é uma parte Fc de imunoglobulina, um domínio C<sub>H</sub>3 de imunoglobulina, um domínio C<sub>H</sub>4 de imunoglobulina, um peptídeo de ligação de albumina ou uma proteína de ligação de albumina.

[0049] Em outra modalidade, as muteínas de lipocalina da descrição são conjugadas a um composto que prolonga a meia vida em soro da muteína. Mais preferencialmente, as muteínas são conjugadas com um composto selecionado dentre o grupo que consiste em uma molécula de polialquíleno glicol, um hidroxietilamido, uma parte Fc de uma imunoglobulina, um domínio C<sub>H</sub>3 de uma imunoglobulina, um domínio

$\text{C}_\text{H}4$  de uma imunoglobulina, um peptídeo de ligação a albumina e uma proteína de ligação a albumina.

[0050] Em ainda outra modalidade, a presente descrição refere-se a moléculas de ácidos nucleicos que compreendem sequências de nucleotídeos que codificam muteínas de lipocalina divulgadas no presente documento. A descrição engloba uma célula hospedeira que contém a mencionada molécula de ácido nucleico.

#### **A. Muteínas de lipocalina específicas para LAG-3**

[0051] Em um aspecto, a presente descrição fornece muteínas de lipocalina humana que se ligam a LAG-3 humano com alta afinidade e aplicações úteis de tais muteínas. A descrição também fornece métodos para produzir proteínas de ligação de LAG-3 descritas no presente documento, assim como composições que compreendem tais proteínas. As proteínas de ligação de LAG-3 da descrição, assim como composições da mesma, podem ser usadas em métodos para detectar proteína de LAG-3 em uma amostra ou em métodos de ligação de LAG-3 em um sujeito para estimular ou inibir respostas imunes. As proteínas de ligação de LAG-3 reveladas têm bioestabilidade intensificada e têm um padrão de ligação similar ou comparável tanto a LAG-3 humano quanto cinomolgo. Por fim, a descrição fornece métodos de uso das muteínas de lipocalina contra LAG-3 para inibir a ligação de LAG-3 a moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) da classe II. Nenhuma muteína de lipocalina humana que possui essas características correspondentes aos usos fornecidos pela presente invenção foi descrita anteriormente.

#### **1. Exemplo de muteínas de lipocalina específicas para LAG-3**

[0052] Algumas modalidades da presente descrição se referem a uma muteína de lipocalina que tem capacidade para ligar LAG-3, preferencialmente LAG-3 humano (huLAG-3), com uma afinidade medida por um  $K_\text{d}$  de cerca de 80 nM, 60 nM, 40 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 8 nM, 6

nM, 4 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,05 nM, ou mais baixo. Essa afinidade pode ser determinada, por exemplo, por análise de ressonância de plasmon de superfície (SPR) essencialmente descrita no **Exemplo 4**.

[0053] Em outras modalidades, a muteína de ligação de LAG-3 de lipocalina pode ser reativa de modo cruzado com LAG-3 cinomolgo (cyLAG-3) e, em algumas modalidades adicionais, ter capacidade para ligar cyLAG-3 com uma afinidade medida por um  $K_d$  de cerca de 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, ou até mesmo menor, como cerca de 0,46 nM. Essa afinidade pode ser determinada, por exemplo, por meio de análise de SPR essencialmente descrita no **Exemplo 4**.

[0054] Em outras modalidades, a muteína de lipocalina tem capacidade para ligar LAG-3 em células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com huLAG-3 com um valor de  $EC_{50}$  de cerca de 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1 nM, 0,5 nM ou mais baixo, como cerca de 0,22 nM ou 0,02 nM. Em outras modalidades, a muteína de lipocalina tem capacidade para ligar LAG-3 em células de CHO transfectadas com cyLAG-3 com uma  $EC_{50}$  de cerca de 350 nM, 300 nM, 250 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM, ou até mesmo mais baixa, como cerca de 9,3 nM. O valor de  $EC_{50}$  pode, por exemplo, ser determinado por uma separação de células ativadas por fluorescência (FACS) conforme essencialmente descrito no **Exemplo 5**.

[0055] Em algumas modalidades, a muteína de lipocalina é capaz de inibir a ligação de LAG-3 a MHC da classe II, como as expressas sobre células que apresentam antígeno (APCs) ou células de tumores. O modo de ação inibidor pode, por exemplo, ser determinado por meio de análise FACS conforme descrito essencialmente no **Exemplo 6**.

[0056] Em um aspecto, a presente descrição fornece muteínas hTlc de ligação de LAG-3.

[0057] Em relação a isso, a descrição fornece uma ou mais muteínas de hTlc que têm capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por um  $K_d$  de cerca de 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 4 nM ou menos, 3 nM ou menos, 2 nM ou menos, 1,5 nM ou menos, 1 nM ou menos, 0,75 nM ou menos, 0,5 nM ou menos, 0,25 nM ou menos, ,1 nM ou menos, ou até mesmo cerca de 0,05 nM ou menos.

[0058] Em algumas modalidades, tal muteína de hTlc compreende resíduo de aminoácido que sofreu mutação (ou resíduos de aminoácido que sofreram mutação) em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais posições correspondentes a posições 5, 7–8, 10, 14, 16, 25–34, 44, 46, 52–53, 55–56, 58, 60–61, 63, 65–66, 69–70, 73, 79–80, 84–86, 89–90, 93, 96–98, 101, 105–106, 108, 110–114, 121, 124, 148–150, e 152–154 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0059] Em algumas modalidades particulares, tais muteínas de hTlc podem conter o resíduo de aminoácido que sofreu mutação (ou resíduos de aminoácido que sofreram mutação) em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais posições correspondentes a posições 5, 7–8, 10, 16, 26–34, 44, 46, 53, 56, 58, 60–61, 63, 65, 69–70, 73, 79–80, 85, 89–90, 93, 96–98, 101, 105–106, 108, 111, 114, 124, 148–150, e 152–154 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0060] Em algumas modalidades particulares, tais muteínas de hTlc podem conter o resíduo de aminoácido que sofreu mutação (ou resíduos de aminoácido que sofreram mutação) em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 posições correspondente a posições 14, 25–26, 28, 31–32, 52, 55, 58, 66, 79, 84, 86, 101, 105–106, 108, 110, 112–114, e 121 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0061] Em algumas modalidades particulares, tais muteínas de hTlc

podem incluir o resíduo de aminoácido que sofreu mutação (ou resíduos de aminoácido que sofreram mutação) em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, ou 26 posições correspondentes a posições 5, 8, 26–34, 56, 58, 60–61, 65, 69, 85, 101, 105–106, 108, 111, 114, e 153–154 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0062] Em algumas modalidades particulares, tais muteínas de hTlc podem incluir o resíduo de aminoácido que sofreu mutação (ou resíduos de aminoácido que sofreram mutação) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 posições correspondentes a posições 14, 25–26, 28, 32, 52, 55, 58, 66, 79, 84, 86, 101, 105, 106, 108, 110, 112, 114, e 121 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0063] Em algumas modalidades particulares, tais muteínas de hTlc podem incluir o resíduo de aminoácido que sofreu mutação (ou resíduos de aminoácido que sofreram mutação) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 posições correspondentes a posições 26–34, 56, 58, 60–61, 65, 70, 101, 105–106, 108, 111, 114, e 153 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0064] Em algumas modalidades particulares, tais muteínas de hTlc podem incluir o resíduo de aminoácido que sofreu mutação (ou resíduos de aminoácido que sofreram mutação) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 posições correspondentes a posições 26–34, 56, 58, 60–61, 63, 65, 101, 105–106, 108, 111, 114, 149, e 153 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0065] Em algumas modalidades particulares, tais muteínas de hTlc podem incluir o resíduo de aminoácido que sofreu mutação (ou resíduos de aminoácido que sofreram mutação) em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, ou 27 posições

correspondentes a posições 5, 7-8, 10, 16, 44, 46, 63, 65, 69-70, 73, 80, 84, 89-90, 93, 96-98, 113, 124, 148-150, 152, ou 154 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0066] Em algumas modalidades adicionais, as muteínas de hTlc podem compreender pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 resíduos de aminoácido que sofreram mutação em uma ou mais posições de sequência correspondentes às posições de sequência 5, 8, 65, 69, 85 e 154 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1), e em que o dito polipeptídeo se liga a LAG-3, em particular, huLAG-3.

[0067] Em algumas modalidades adicionais, as muteínas de hTlc podem compreender pelo menos 1, 2 ou 3 resíduos de aminoácido que sofreram mutação em uma ou mais posições de sequência correspondentes às posições de sequência 63, 65 e 149 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1), e em que o dito polipeptídeo se liga a LAG-3, incluindo huLAG-3.

[0068] Em algumas modalidades adicionais, as muteínas de hTlc podem compreender pelo menos 1, 2, 3 ou 4 resíduos de aminoácido que sofreram mutação em uma ou mais posições de sequência correspondentes às posições de sequência 26, 84, 106 e 112 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1), e em que o dito polipeptídeo se liga a LAG-3, incluindo huLAG-3.

[0069] Em algumas modalidades ainda adicionais, a descrição se refere a um polipeptídeo, em que o dito polipeptídeo é uma muteína de hTlc, em comparação com a sequência de polipeptídeo linear de hTlc (SEQ ID NO: 1), que compreende pelo menos 1 resíduo de aminoácido que sofreu mutação (ou resíduos de aminoácido que sofreram mutação) na posição de sequência 84, e em que o dito polipeptídeo se liga a LAG-3, em particular, huLAG-3.

[0070] Em algumas modalidades, uma muteína de lipocalina de acordo com a descrição pode incluir pelo menos uma substituição de

aminoácido de um resíduo de cisteína nativo por, por exemplo, um resíduo de serina. Em algumas modalidades, uma muteína de hTlc de acordo com a descrição inclui uma substituição de aminoácidos de um resíduo de cisteína nativa nas posições 61 e/ou 153 por outro aminoácido tal como um resíduo de serina. Neste contexto, é observado que foi constatado que a remoção da ligação de dissulfeto estrutural (no nível de uma respectiva biblioteca de ácido nucleico não exposta) de lipocalina de lágrima do tipo selvagem que é formada pelos resíduos de cisteína 61 e 153 (cf. Breustedt *et al.*, J Biol Chem, 2005) pode fornecer muteínas de hTlc que não só são dobradas de modo estável, como também podem ligar um dado ligante não natural com alta afinidade. Em algumas modalidades particulares, a muteína de hTlc de acordo com a descrição inclui as substituições de aminoácido Cys 61 → Ala, Phe, Lys, Arg, Thr, Asn, Gly, Gln, Asp, Asn, Leu, Tyr, Met, Ser, Pro ou Trp, e/ou Cys 153 → Ser ou Ala. Tais substituições se demonstraram úteis para impedir a formação da ponte de dissulfeto de ocorrência natural que liga Cys 61 e Cys 153 e, desse modo, para facilitar a manipulação da muteína. Muteínas hTlc que ligam LAG-3 e possuem a ponte de dissulfeto formada entre Cys 61 e Cys 153, entretanto, também são partes da presente descrição.

[0071] Em algumas modalidades, a eliminação da ligação de dissulfeto estrutural pode fornecer a vantagem adicional de permitir a geração (espontânea) ou a introdução deliberada de ligações de dissulfeto artificiais não naturais em muteínas da descrição, de forma a aumentar a estabilidade das muteínas. Em algumas modalidades, dois ou todos os três códons de cisteína na posição 61, 101 e 153, por exemplo, são substituídos por um códon de outro aminoácido. Além disso, em algumas modalidades, muteína hTlc de acordo com a descrição inclui uma substituição de aminoácido de um resíduo de cisteína nativa na posição 101 por um resíduo de serina ou resíduo de histidina.

[0072] Muteínas hTlc que ligam LAG-3 e possuem a ponte de dissulfeto formada entre Cys 61 e Cys 153, entretanto, também são partes da presente descrição. Em algumas modalidades particulares, as muteínas de hTlc que não incluem aminoácidos que sofreram mutações nas posições 61 e 153 e têm a ligação de dissulfeto formada entre Cys 61 e Cys 153. Em algumas modalidades particulares, as muteínas de hTlc com aminoácido que sofreu mutação (ou aminoácidos que sofreram mutação) na posição (ou posições) 61 e/ou 153 são submetidas à mutagênese adicional para restaurar a ligação de dissulfeto natural por posições de retromutação 61 e/ou 153 para a cisteína nativa.

[0073] Em algumas modalidades, uma muteína de acordo com a descrição inclui uma substituição de aminoácido de um aminoácido nativo por um resíduo de cisteína nas posições 28 ou 105 em relação à sequência de aminoácido de hTlc (SEQ ID NO: 1).

[0074] Adicionalmente, em algumas modalidades, a muteína de acordo com a descrição inclui uma substituição de aminoácido de um resíduo de arginina nativo nas posições 111 por um resíduo de prolina em relação à sequência de aminoácidos de hTlc (SEQ ID NO: 1). Adicionalmente, em algumas modalidades, a muteína de acordo com a descrição inclui uma substituição de aminoácido de um resíduo de lisina nativo nas posições 114 por um resíduo de triptofano ou um ácido glutâmico em relação à sequência de aminoácidos de hTlc (SEQ ID NO: 1).

[0075] Em algumas modalidades, uma muteína de lipocalina de acordo com a descrição pode incluir um ou mais aminoácidos que sofreram mutação para um resíduo de asparagina para introduzir um ou mais sítios de glicosilação. Em algumas modalidades preferenciais, uma muteína de acordo com a descrição inclui uma mutação de aminoácido na posição 12 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1). Por exemplo, uma muteína de acordo com a descrição pode

ter o seguinte resíduo de aminoácido que sofreu mutação em relação à sequência de aminoácidos de hTlc (SEQ ID NO: 1): Asp 12 → Asn.

[0076] Em algumas modalidades, uma mutéina de acordo com a descrição inclui uma substituição de aminoácido na posição 5 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1). Por exemplo, uma mutéina de acordo com a descrição pode ter o seguinte resíduo de aminoácido que sofreu mutação em relação à sequência de aminoácidos de hTlc (SEQ ID NO: 1): Ala 5 → Thr.

[0077] Adicionalmente, em algumas modalidades, uma mutéina de acordo com a descrição pode incluir pelo menos uma substituição de aminoácido de um resíduo negativamente carregado nativo por resíduo neutro, em que o resíduo negativamente carregado nativo não está envolvido na ligação a LAG-3, e em que a substituição resulta em um ponto isoelétrico aumentado (pI) da mutéina. Em algumas modalidades particulares, tais resíduos negativamente carregados nativos e posições incluem Asp 7, Glu 9, Asp 12, Glu 45, Asp 72, Glu 73, Asp 80, e Asp 95 em relação à sequência de aminoácidos de hTlc (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades particulares, tais resíduos de aminoácido neutros incluem Asn, Arg e Lys. Em algumas modalidades particulares adicionais, uma mutéina de acordo com a descrição inclui um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácido que sofreram mutação nas posições 7, 9, 12, 45, 72, 73, 80 e 95 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1): Asp 7 → Asn, Arg, ou Lys; Glu 9 → Gln, Arg, ou Lys; Asp 12 → Asn ou Arg; Glu 45 → Arg; Asp 72 → Asn, Arg, ou Lys; Glu 73 → Arg; Asp 80 → Gly; e Asp 95 → Asn, Arg, ou Lys. As mutéinas exemplificativas incluem SEQ ID NOs: 57 a 60, 63, 66.

[0078] Em algumas modalidades, uma mutéina de hTlc de ligação de LAG-3 de acordo com a descrição inclui, em uma ou mais posições correspondentes às posições 5, 7–8, 10, 14, 16, 25–34, 44, 46, 52–53, 55–56, 58, 60–61, 63, 65–66, 69–70, 73, 79–80, 84–86, 89–90, 93, 96–

98, 101, 105–106, 108, 110–114, 121, 124, 148–150, e 152–154 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácido que sofreram mutação: Ala 5 → Thr; Asp 7 → Gly; Glu 8 → Gln; Ile 10 → Phe; Ser 14 → Pro; Thr 16 → Met; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser, Asp, Glu, Ala, ou Gly; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys ou Asp; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile ou Leu; Asn 32 → Asp, Met, ou Thr; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 44 → His; Gly 46 → Asp; Lys 52 → Arg; Val 53 → Ala; Met 55 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe ou Asp; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Ala 66 → Asn; Glu 69 → Gly; Lys 70 → Arg; Glu 73 → Ala; Ala 79 → Thr ou Glu; Asp 80 → Gly; His 84 → Tyr ou Leu; Val 85 → Ala ou Asp; Ala 86 → Asp; Ile 89 → Ser ou Asn; Arg 90 → Ser; Val 93 → Glu; His 96 → Asn; Tyr 97 → His; Ile 98 → Val; Cys 101 → Ser ou Phe; Leu 105 → Cys ou Gly; His 106 → Ala, Gln, Glu, Lys, ou Pro; Lys 108 → Tyr ou Thr; Val 110 → Gly ou Asn; Arg 111 → Pro; Gly 112 → Met, Val, ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu; Lys 114 → Trp ou Ala; Lys 121 → Thr; Leu 124 → Gln; Arg 148 → Trp; Gln 149 → Leu; Ser 150 → Gly; Thr 152 → Pro; Cys 153 → Ser; e Ser 154 → Ala. Em algumas modalidades, uma mutéína de hTlc de acordo com a descrição inclui dois ou mais, como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou até mesmo mais, como 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou até mesmo mais resíduos de aminoácido que sofreram mutação nessas posições de sequência de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0079] Em algumas modalidades, a mutéína de hTlc de ligação de LAG-3 de acordo com a descrição inclui, em uma ou mais posições correspondentes às posições 14, 25–26, 28, 31–32, 52, 55, 58, 66, 79, 84, 86, 101, 105–106, 108, 110, 112–114, e 121 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácido que sofreram mutação: Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser, Asp, Glu, Ala, ou Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 →

Leu; Asn 32 → Met ou Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr ou Leu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln, Glu, Lys, ou Pro; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly ou Asn; Gly 112 → Met, Val, ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr. Em algumas modalidades, uma mutéína de hTlc de acordo com a descrição inclui dois ou mais, como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou até mesmo mais, como 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 resíduos de aminoácido que sofreram mutação nessas posições de sequência de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0080] Em algumas modalidades, uma mutéína de hTlc de ligação de LAG-3 de acordo com a descrição inclui, em uma ou mais posições correspondentes às posições 5, 7–8, 10, 16, 26–34, 44, 46, 53, 56, 58, 60–61, 63, 65–66, 69–70, 73, 79–80, 85, 89–90, 93, 96–98, 101, 105–106, 108, 110–111, 114, 121, 124, 148–150, e 152–154 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácido que sofreram mutação: Ala 5 → Thr; Asp 7 → Gly; Glu 8 → Gln; Ile 10 → Phe; Thr 16 → Met; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 44 → His; Gly 46 → Asp; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Lys 70 → Arg; Glu 73 → Ala; Ala 79 → Thr; Asp 80 → Gly; Val 85 → Ala ou Asp; Ile 89 → Ser ou Asn; Arg 90 → Ser; Val 93 → Glu; His 96 → Asn; Tyr 97 → His; Ile 98 → Val; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Leu 124 → Gln; Arg 148 → Trp; Gln 149 → Leu; Ser 150 → Gly; Thr 152 → Pro; Cys 153 → Ser; e Ser 154 → Ala. Em algumas modalidades, uma mutéína de hTlc de acordo com a descrição inclui dois ou mais, como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou até mesmo mais, como 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,

23, 24, 25, 26, 27 ou até mesmo mais resíduos de aminoácido que sofreram mutação nessas posições de sequência de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0081] Em algumas modalidades, uma mutoína de hTlc de ligação de LAG-3 de acordo com a descrição inclui, em uma ou mais posições correspondentes às posições 5, 7–8, 10, 16, 26–34, 44, 46, 53, 56, 58, 60–61, 63, 65, 69–70, 73, 79–80, 85, 89–90, 93, 96–98, 101, 105–106, 108, 111, 114, 124, 148–150, e 152–154 da sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácido que sofreram mutação: Ala 5 → Thr; Asp 7 → Gly; Glu 8 → Gln; Ile 10 → Phe; Thr 16 → Met; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 44 → His; Gly 46 → Asp; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Lys 70 → Arg; Glu 73 → Ala; Ala 79 → Thr; Asp 80 → Gly; Val 85 → Ala ou Asp; Ile 89 → Ser ou Asn; Arg 90 → Ser; Val 93 → Glu; His 96 → Asn; Tyr 97 → His; Ile 98 → Val; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Leu 124 → Gln; Arg 148 → Trp; Gln 149 → Leu; Ser 150 → Gly; Thr 152 → Pro; Cys 153 → Ser; e Ser 154 → Ala. Em algumas modalidades, uma mutoína de hTlc de acordo com a descrição inclui dois ou mais, como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou até mesmo mais, como 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou até mesmo mais resíduos de aminoácido que sofreram mutação nessas posições de sequência de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0082] Em algumas modalidades, as mutoínas de hTlc de ligação de LAG-3 incluem as seguintes mutações de aminoácido em comparação com a sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1): Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 →

Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; e adicionalmente uma ou mais, incluindo 2, 3, 4, 5, 6, ou 7, ou até mesmo mais, dentre as seguintes mutações de aminoácido: Ala 5 → Thr; Asp 7 → Gly; Glu 8 → Gln; Ile 10 → Phe; Thr 16 → Met; Leu 44 → His; Gly 46 → Asp; Val 53 → Ala; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Lys 70 → Arg; Glu 73 → Ala; Ala 79 → Thr; Asp 80 → Gly; Val 85 → Ala ou Asp; Ile 89 → Ser ou Asn; Arg 90 → Ser; Val 93 → Glu; His 96 → Asn; Tyr 97 → His; Ile 98 → Val; Leu 124 → Gln; Arg 148 → Trp; Gln 149 → Leu; Ser 150 → Gly; Thr 152 → Pro; e Ser 154 → Ala.

[0083] Em algumas modalidades, as mutoínas de hTlc de ligação de LAG-3 incluem as seguintes mutações de aminoácido em comparação com a sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1): Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Phe 28 → Asp; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; e um ou mais, incluindo 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou até mais, dentre as seguintes mutações de aminoácido: Arg 26 → Ser, Asp, Glu, Ala, ou Gly; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; Leu 56 → Asp; His 84 → Tyr ou Leu; His 106 → Gln, Glu, Lys, ou Pro; Val 110 → Gly ou Asn; Gly 112 → Met, Val ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu.

[0084] Em algumas modalidades, as mutoínas de hTlc de ligação de LAG-3 incluem as seguintes mutações de aminoácido em comparação com a sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1): Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Phe 28 → Asp; Lys 52 → Arg; Met

55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; e um ou mais, incluindo 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou até mais, dentre as seguintes mutações de aminoácido: Arg 26 → Ser, Asp, Glu, Ala, ou Gly; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr ou Leu; His 106 → Gln, Glu, Lys, ou Pro; Val 110 → Gly ou Asn; Gly 112 → Met, Val ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu.

[0085] Em algumas modalidades, as mutoínas de hTlc de ligação de LAG-3 incluem as seguintes mutações de aminoácido em comparação com a sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1): Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Phe 28 → Asp; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; e um ou mais, incluindo 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou até mais, dentre as seguintes mutações de aminoácido: Arg 26 → Ser, Asp, Glu, ou Ala; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; Leu 56 → Asp; His 84 → Tyr ou Leu; His 106 → Glu, Lys, ou Pro; Val 110 → Asn; Gly 112 → Val ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu.

[0086] Em algumas modalidades adicionais, as mutoínas de hTlc de ligação de LAG-3 incluem um dos conjuntos seguintes de mutações de aminoácido em comparação com a sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1):

(a) Ala 5 → Thr; Glu 8 → Gln; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; e Ser 154 → Ala;

(b) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33

→ Asp; Glu 34 → Val; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Gly; e Cys 153 → Ser;

(c) Asp 7 → Gly; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Arg 148 → Trp; Thr 152 → Pro; e Cys 153 → Ser;

(d) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Ala 79 → Thr; Tyr 97 → His; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(e) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Val 85 → Asp; Arg 90 → Ser; His 96 → Asn; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Leu 124 → Gln; e Cys 153 → Ser;

(f) Thr 16 → Met; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 44 → His; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Ile 89 → Ser; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(g) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu

34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Gln 149 → Leu; e Cys 153 → Ser;

(h) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Lys 70 → Arg; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(i) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Asp 80 → Gly; Ile 89 → Asn; Ile 98 → Val; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(j) Ile 10 → Phe; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Glu 73 → Ala; Ile 89 → Asn; Val 93 → Glu; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(k) Ala 5 → Thr; Glu 8 → Gln; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; e Ser 154 → Ala;

(l) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu

34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(m) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(n) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(o) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Val; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(p) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Leu; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(q) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(r) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ala; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala

66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Lys; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(s) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Asn; Gly 112 → Met; Val 113 → Ala; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(t) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Pro; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(u) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Leu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Val 113 → Leu; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(v) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Met; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr; ou

(w) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Gln 149 → Leu.

[0087] Em algumas modalidades adicionais, as mutações de hTlc de ligação de LAG-3 incluem um dos conjuntos seguintes de mutações de

aminoácido em comparação com a sequência de polipeptídeo linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1):

- (a) Ala 5 → Thr; Glu 8 → Gln; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Val 85 → Ala; e Ser 154 → Ala;
- (b) Ala 5 → Thr; Gly 46 → Asp; Lys 65 → Glu; Val 85 → Ala; e Ser 150 → Gly
- (c) Asp 7 → Gly; Val 85 → Asp; Arg 148 → Trp; e Thr 152 → Pro;
- (d) Ala 5 → Thr; Val 53 → Ala; Lys 65 → Glu; Ala 79 → Thr; e Tyr 97 → His;
- (e) Glu 63 → Asp; Val 85 → Asp; Arg 90 → Ser; His 96 → Asn; e Leu 124 → Gln;
- (f) Thr 16 → Met; Leu 44 → His; Lys 65 → Glu; e Ile 89 → Ser;
- (g) Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; e Gln 149 → Leu;
- (h) Lys 65 → Glu e Lys 70 → Arg;
- (i) Ala 5 → Thr; Lys 65 → Glu; Asp 80 → Gly; Ile 89 → Asn; e Ile 98 → Val
- (j) Ile 10 → Phe; Lys 65 → Glu; Glu 73 → Ala; Ile 89 → Asn; e Val 93 → Glu;
- (k) Arg 26 → Asp; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Met;
- (l) Arg 26 → Glu; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Met;
- (m) Arg 26 → Glu; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Glu; e Gly 112 → Val;
- (n) Arg 26 → Asp; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Leu;
- (o) Arg 26 → Ser; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Met;

- (p) Arg 26 → Ala; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Lys; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Met;
- (q) Asn 32 → Thr; His 106 → Gln; Val 110 → Asn; Gly 112 → Met; e Val 113 → Ala;
- (r) Arg 26 → Gly; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Pro; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Met; ou
- (s) Arg 26 → Asp; Asn 32 → Thr; His 84 → Leu; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; e Val 113 → Leu.

[0088] Em algumas modalidades adicionais, a muteína de hTlc de ligação de LAG-3 inclui a seguinte mutação de aminoácido em comparação com a sequência de polipeptídeo linear da hTlc (SEQ ID NO: 1): inserção de Pro entre as posições 156 e 157.

[0089] Na região residual, isto é, a região que difere de posições de sequência 5, 7–8, 10, 14, 16, 25–34, 44, 46, 52–53, 55–56, 58, 60–61, 63, 65–66, 69–70, 73, 79–80, 84–86, 89–90, 93, 96–98, 101, 105–106, 108, 110–114, 121, 124, 148–150, 152–154, e 157, uma muteína de hTlc da descrição pode incluir a sequência de aminoácidos (natural) do tipo selvagem de hTlc madura (SEQ ID NO: 1) fora das posições de sequência de aminoácidos que sofreram mutação ou resíduos de aminoácido que sofreram mutação em tais posições.

[0090] A menos que indicado de outro modo, a posição de um resíduo de uma muteína de hTlc descrita no presente documento é numerada em comparação com a sequência de polipeptídeo linear da hTlc (SEQ ID NO: 1).

[0091] Em modalidades ainda adicionais, uma muteína de hTlc de acordo com a descrição atual tem pelo menos 70% de identidade de sequência ou pelo menos 70% de homologia de sequência com a sequência de hTlc madura (SEQ ID NO: 1). Como exemplo ilustrativo, a muteína da SEQ ID NO: 8 tem uma identidade de sequência de aminoácidos ou uma homologia de sequência de aproximadamente 81,8%

com a sequência de aminoácidos de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0092] Em modalidades particulares adicionais, uma muteína de hTlc da descrição compreende uma sequência de aminoácidos conforme apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 7 a 28, 57 a 70 e 85 a 95 ou um de fragmento ou variante das mesmas.

[0093] Em modalidades particulares adicionais, uma muteína de hTlc da descrição tem pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85% ou mais, pelo menos 90% ou mais, pelo menos 95% ou mais, pelo menos 97,5% ou mais, pelo menos 98% ou mais ou pelo menos 99% ou mais identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 8 a 18, 20 a 28, 57 a 70 e 85 a 95.

[0094] A descrição também inclui homólogos estruturais de uma muteína de hTlc que tem uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 7 a 28, 57 a 70 e 85 a 95, cujos homólogos estruturais têm uma homologia de sequência de aminoácidos ou identidade de sequência de mais do que cerca de 60%, preferencialmente mais do que 65%, mais do que 70%, mais do que 75%, mais do que 80%, mais do que 85%, mais do que 90%, mais do que 92% e com máxima preferência mais do que 95% em relação à dita muteína de hTlc.

[0095] Uma muteína de hTlc de acordo com a presente descrição pode ser obtida por meio de mutagênese de uma forma de ocorrência natural de hTlc madura (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades da mutagênese, uma substituição é uma substituição conservadora. Independentemente, qualquer substituição—incluindo substituição não conservativa ou uma ou mais das substituições exemplificativas abaixo—é prevista enquanto a muteína de lipocalina retiver sua capacidade para se ligar a LAG-3, e/ou tiver uma identidade de sequência com a sequência então substituída em que tem pelo menos 60%, como pelo menos

65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85% ou mais identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[0096] Em algumas modalidades particulares, a presente descrição fornece uma muteína de lipocalina que se liga a LAG-3 humano com uma afinidade medida por um  $K_d$  de cerca de 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 4 nM ou menos, 3 nM ou menos, 2 nM ou menos, 1 nM ou menos, 0,5 nM ou menos, 0,1 nM ou menos ou 0,05 nM ou menos. Em algumas modalidades, a muteína de lipocalina tem pelo menos 90% ou mais, como 95% ou mais, 97,5% ou mais, 98% ou mais, ou 99% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 7 e 19.

## **2. Aplicações de muteínas de lipocalina específicas para LAG-3.**

[0097] Várias aplicações possíveis para as muteínas de lipocalina de ligação de LAG-3 da descrição existem na medicina.

[0098] Em um aspecto adicional, a descrição refere-se ao uso de muteína de lipocalina de ligação de LAG-3 divulgada no presente documento para detectar LAG-3 em amostras, bem como um método de diagnóstico correspondente.

[0099] A presente descrição também envolve o uso de uma ou mais muteínas de lipocalina de ligação de LAG-3 conforme descrito para formação de complexos com LAG-3.

[0100] Em outro aspecto da descrição, portanto, as muteínas de lipocalina descritas são utilizadas para detecção de LAG-3. Tal uso pode incluir as etapas de colocar uma ou mais ditas muteínas, sob condições adequadas, em contato com uma amostra suspeita de conter LAG-3, assim permitindo a formação de um complexo entre as muteínas e LAG-3 e detectando o complexo por um sinal adequado. O sinal detectável pode ser causado por uma marca, conforme explicado acima, ou por uma mudança de propriedades físicas devido à ligação, isto é, a formação de complexo,

em si. Um exemplo é ressonância de plasmon de superfície, cujo valor é mudado durante a ligação de parceiros de ligação a partir do qual um é imobilizado em uma superfície, como uma folha de ouro.

[00101] As muteínas de lipocalina de ligação de LAG-3 reveladas no presente documento também podem ser usadas para a separação de LAG-3. Tal uso pode incluir as etapas de colocar uma ou mais ditas muteínas, sob condições adequadas, em contato com uma amostra que é prevista conter LAG-3, assim permitindo a formação de um complexo entre as muteínas e LAG-3 e separando o complexo da amostra.

[00102] Durante o uso das muteínas divulgadas para a detecção de LAG-3, bem como a separação de LAG-3, as muteínas e/ou LAG-3 ou um de seus domínios ou fragmentos podem ser imobilizados sobre uma fase sólida apropriada.

[00103] Em ainda outro aspecto, a presente descrição apresenta um kit de diagnóstico ou analítico que compreende uma muteína de lipocalina de ligação de LAG-3 de acordo com a presente invenção.

[00104] Além do seu uso em diagnóstico, em ainda outro aspecto, a descrição contempla uma composição farmacêutica que compreende uma muteína da descrição e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

[00105] Além disso, a presente descrição fornece muteínas de lipocalina humana que ligam LAG-3 para uso como agentes anticâncer e/ou moduladores da imunidade. Como tais, as muteínas de lipocalina da presente descrição que se ligam a LAG-3 são previstas como sendo usadas em um método de tratamento ou prevenção de doenças humanas, como câncer, doenças infecciosas e doenças autoimunes. Consequentemente, também são fornecidos métodos para tratamento ou prevenção de doenças humanas, como câncer, doenças infecciosas e doenças autoimunes em um sujeito que necessita dos mesmos, que compreende administrar ao dito sujeito uma quantidade terapeuticamente

eficaz de uma muteína de lipocalina da presente invenção que liga LAG-3.

### **B. Muteínas de lipocalina de acordo com a presente invenção**

[00106] Lipocalinas são moléculas de ligação proteináceas que evoluíram naturalmente para ligar ligantes. Lipocalinas ocorrem em muitos organismos, incluindo vertebrados, insetos, plantas e bactérias. Os membros da família de proteína de lipocalina (Pervaiz e Brew, FASEB J, 1987) são proteínas secretadas tipicamente pequenas e têm uma cadeia de polipeptídeo única. Os mesmos são caracterizados por uma faixa de propriedades de reconhecimento molecular diferentes: sua ligação a várias moléculas pequenas, principalmente hidrofóbicas (como retinoides, ácidos graxos, colesteróis, prostaglandinas, biliverdinas, feromônios, flavorizantes e odorantes), e para receptores de superfície de célula específicos e sua formação de complexos macromoleculares. Embora elas tenham sido classificadas no passado como proteínas de transporte, agora é claro que as lipocalinas atendem a uma série de funções fisiológicas. As mesmas incluem funções no transporte de retinol, olfato, sinalização de feromônio e síntese de prostaglandinas. Lipocalinas também foram relacionadas à regulagem da reação imunológica e à mediação da homeostase celular (analisada, por exemplo, em Flower *et al.*, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower, Biochem J, 1996).

[00107] Lipocalinas compartilham níveis incomumente baixos de conservação geral de sequências, frequentemente com identidades de sequências de menos de 20%. Em forte contraste, o seu padrão de dobra geral é altamente conservado. A parte central da estrutura de lipocalina consiste de uma única folha  $\beta$  antiparalela com oito fitas, fechada sobre si própria para formar um cilindro  $\beta$  continuamente ligado por hidrogênio. Esse cilindro  $\beta$  forma uma cavidade central. Uma extremidade do cilindro é bloqueada estericamente pelo segmento de peptídeos N-terminal que corre ao longo do seu fundo, bem como três circuitos de

peptídeos que conectam as fitas  $\beta$ . A outra extremidade do cilindro  $\beta$  é aberta para o solvente e engloba um local de ligação de alvo, formado por quatro circuitos de peptídeos flexíveis. A diversidade dos circuitos na estrutura de lipocalina que, de outra forma, é rígida gera uma série de modos de ligação diferentes, cada qual capaz de acomodar alvos com diferente tamanho, formato e características químicas (analizado, por exemplo, em Skerra, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower *et al.*, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower, Biochem J, 1996).

[00108] Quando utilizada no presente documento no contexto das muteínas de lipocalina da presente descrição que se ligam a LAG-3, a expressão "específico para" inclui que a muteína de lipocalina é dirigida contra, liga-se a ou reage com LAG-3. Desta forma, ser dirigido a, ligar-se a ou reagir com inclui que a muteína de lipocalina liga-se especificamente a LAG-3. O termo "especificamente" neste contexto significa que a muteína de lipocalina reage com uma proteína LAG-3, conforme descrito no presente documento, mas essencialmente não com outra proteína. O termo "outra proteína" inclui qualquer proteína não LAG-3, incluindo proteínas proximamente relacionadas a ou homólogas a LAG-3 ao qual as lipocalinas reveladas no presente documento são direcionadas. Entretanto, as proteínas de LAG-3, fragmentos e/ou variantes de espécies diferentes das humanas, como aquelas descritas no contexto da definição "sujeito" não são excluídas pelo termo "outra proteína". O termo "não se liga essencialmente" significa que a muteína de lipocalina da presente descrição não se liga a outra proteína, isto é, mostra uma reatividade cruzada de menos do que 30%, preferencialmente 20%, mais preferencialmente 10%, de modo particularmente preferencial menos do que 9, 8, 7, 6 ou 5%. A possibilidade de a lipocalina reagir especificamente conforme definido no presente documento acima pode ser facilmente testada, inter alia, comparando-se a reação de uma muteína de lipocalina da presente descrição com LAG-3 e a reação da dita lipocalina com (uma)

outra proteína (ou proteínas). "Ligaçāo específica" também pode ser determinada, por exemplo, de acordo com Western blot, ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IHC, e varreduras de peptídeo.

[00109] A sequência de aminoácidos de uma muteína de lipocalina de acordo com a descrição possui alta identidade de sequências para a lipocalina de referência, tal como hTlc, em comparação com essa identidade de sequências de muteína com outra lipocalina. Neste contexto geral, a sequência de aminoácidos de uma muteína de lipocalina da combinação de acordo com a descrição é pelo menos substancialmente similar à sequência de aminoácidos da lipocalina do tipo selvagem correspondente ou referência. Uma sequência correspondente de muteína de lipocalina da combinação de acordo com a descrição, que é substancialmente similar às sequências da lipocalina de referência correspondente, possui pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 82%, pelo menos 85%, pelo menos 87%, pelo menos 90% de identidade, incluindo pelo menos 95% de identidade com a sequência da lipocalina correspondente. Neste sentido, muteína de lipocalina da descrição pode naturalmente conter, comparativamente, substituições conforme descrito no presente documento que tornam a muteína de lipocalina capaz de ligar-se a LAG-3. Tipicamente, uma muteína de uma lipocalina inclui uma ou mais mutações—em relação à sequência da lipocalina de referência—de aminoácidos nos quatro circuitos na extremidade aberta do local de ligação de ligante de lipocalinas (consultar acima). Conforme explicado acima, essas regiões são essenciais para determinar a especificidade de ligação de muteína de lipocalina para um alvo desejado.

[00110] Muteína da presente descrição pode também conter mutações em regiões fora dos quatro circuitos de peptídeos flexíveis que formam o local de ligação alvo da lipocalina. Muteína de acordo com a presente invenção pode conter, por exemplo, uma ou mais mutações

em um ou mais dos três circuitos de peptídeos (denominados BC, DE e FG) que conectam as fitas  $\beta$  na extremidade fechada da lipocalina. Como exemplo ilustrativo, uma muteína derivada de um polipeptídeo de lipocalina de lágrima ou um homólogo da mesma, pode ter 1, 2, 3, 4 ou mais resíduos de aminoácido que sofreram mutação em qualquer posição de sequência na região N-terminal e/ou nos três circuitos de peptídeo BC, DE e FG dispostos na extremidade da estrutura de cilindro  $\beta$  que está localizada oposta ao bolso de ligação de lipocalina natural. Como exemplo ilustrativo adicional, muteína derivada de um polipeptídeo de lipocalina de lágrima ou um de seus homólogos pode não conter resíduos de aminoácidos que sofreram mutação no circuito de peptídeos DE disposto no final da estrutura de cilindro  $\beta$ , em comparação com sequência do tipo selvagem de lipocalina de lágrima.

[00111] Uma muteína de lipocalina, de acordo com a descrição, inclui uma ou mais, como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou até mesmo 20 substituições em comparação com a lipocalina nativa correspondente, visto que tal muteína de lipocalina deve ter capacidade para se ligar a LAG-3. Por exemplo, uma muteína de lipocalina pode ter uma substituição em uma posição correspondente a uma posição distinta (isto é, a uma posição correspondente) da lipocalina do tipo selvagem que tem a sequência do tipo selvagem de, por exemplo, hTlc. Em algumas modalidades, uma muteína de lipocalina da combinação de acordo com a descrição inclui pelo menos duas substituições de aminoácido, incluindo 2, 3, 4, 5, ou até mais, substituições de aminoácido de um aminoácido nativo por um resíduo de arginina. Consequentemente, o ácido nucleico de uma estrutura de "proteína de referência", conforme descrito no presente documento, é submetido a mutagênese com o propósito de gerar uma muteína de lipocalina que seja capaz de ligar-se a LAG-3.

[00112] Adicionalmente, uma muteína de lipocalina da presente descrição pode compreender uma sequência de aminoácidos heteróloga, como

uma sequência de etiqueta Strep II, em sua Terminação N ou C, preferencialmente terminação C, como na SEQ ID NO: 53 e na SEQ ID NO: 54, sem afetar a atividade biológica (que se liga ao seu alvo, por exemplo, LAG-3) da muteína de lipocalina.

[00113] De modo semelhante, uma muteína de lipocalina da presente descrição pode não ter 1, 2, 3, 4, ou mais aminoácidos em sua extremidade N-terminal e/ou 1, 2, ou mais aminoácidos em sua extremidade C-terminal, em comparação com a respectiva lipocalina de lágrima do tipo selvagem; por exemplo, as SEQ ID NOs: 7 a 28, 57 a 70 e 85 a 95.

[00114] Em algumas modalidades, a substituição (ou reposição) é uma substituição conservativa. Independentemente, qualquer substituição—incluindo substituição não conservativa ou uma ou mais das substituições exemplificativas listadas abaixo—é prevista enquanto a muteína de lipocalina retiver sua capacidade para se ligar a LAG-3, e/ou tiver uma identidade com a sequência então substituída em que é pelo menos 60%, como pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85 % ou mais idêntica à “sequência de referência”.

[00115] As substituições conservativas são geralmente as substituições a seguir, listadas de acordo com o aminoácido a sofrer mutação, cada um seguido por uma ou mais substituições que podem ser consideradas conservativas: Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu. Outras substituições também são permitíveis e podem ser determinadas empiricamente ou de acordo com outras substituições conservadoras ou não conservadoras conhecidas. Como orientação adicional, os oito grupos a seguir contêm, cada um,

aminoácidos que podem ser tipicamente considerados para definir substituições conservativas entre si:

- a. Alanina (Ala), Glicina (Gly);
- b. Ácido aspártico (Asp), Ácido glutâmico (Glu);
- c. Asparagina (Asn), Glutamina (Gln);
- d. Arginina (Arg), Lisina (Lys);
- e. Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Metionina (Met), Valina (Val);
- f. Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr), Triptofano (Trp);
- g. Serina (Ser), Treonina (Thr); e
- h. Cisteína (Cys), Metionina (Met)

[00116] Caso essas substituições resultem em alteração da atividade biológica, alterações mais substanciais, tais como as seguintes, ou conforme descrito mais abaixo com referência a classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos selecionados para uma característica desejada. Os exemplos de mudanças mais substanciais são: Ala → Leu, Ile; Arg → Gln; Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, Norleucina; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala.

[00117] Modificações substanciais das propriedades biológicas da lipocalina são realizadas por meio da seleção de substituintes cujo efeito difere significativamente sobre a manutenção (a) da estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na região da substituição, por exemplo, como conformação helicoidal ou de folha; (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no local-alvo; ou (c) do volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base em propriedades de cadeia lateral comuns: (1) hidrofóbicos: norleucina, metionina, alanina, valina, leucina, iso-leucina; (2) hidrofílicos neutros: cisteína, serina, treonina; (3) ácidos: ácido aspártico, ácido glutâmico; (4) básicos:

asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina; (5) resíduos que influenciam orientação de cadeia: glicina, prolina; e (6) aromáticos: triptofano, tirosina, fenilalanina.

[00118] Substituições não conservadoras causarão a substituição de um membro de uma dessas classes por outra classe. Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação adequada da lipocalina correspondente pode também ser substituído, geralmente por serina, para aumentar a estabilidade oxidativa da molécula e evitar reticulação aberrante. De modo contrário, a ligação de cisteína (ou ligações de cisteína) pode ser adicionada à lipocalina para melhorar sua estabilidade.

[00119] Qualquer mutação, incluindo uma inserção, conforme discutido acima, pode ser alcançada muito facilmente no ácido nucleico, por exemplo, nível de DNA com o uso de métodos padrão estabelecidos. Exemplos ilustrativos de alterações da sequência de aminoácidos são inserções ou deleções, bem como substituições de aminoácidos. Tais substituições podem ser conservativas, isto é, um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido de propriedades quimicamente similares, em particular, em relação à polaridade, assim como tamanho. Os exemplos de substituições conservativas são as substituições entre os membros dos grupos a seguir: 1) alanina, serina e treonina; 2) ácido aspártico e ácido glutâmico; 3) asparagina e glutamina; 4) arginina e lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina e valina; e 6) fenilalanina, tirosina e triptofano. Por outro lado, também é possível introduzir alterações não conservadoras na sequência de aminoácidos. Além disso, em vez de substituir resíduos de aminoácidos isolados, também é possível inserir ou deletar um ou mais aminoácidos contínuos da estrutura primária de lipocalina de lágrima, desde que essas deleções ou inserções resultem em muteína dobrada/funcional estável.

[00120] Modificações da sequência de aminoácidos incluem mutagênese

dirigida de posições de aminoácidos isolados, a fim de simplificar a subclonagem do gene de lipocalina que sofreu mutação ou suas partes, por meio da incorporação de locais de clivagem para certas enzimas de restrição. Além disso, essas mutações podem também ser incorporadas para melhorar ainda mais a afinidade de muteína de lipocalina para um dado alvo, tal como LAG-3. Adicionalmente, podem ser introduzidas mutações, a fim de modular certas características da muteína, tal como para aumentar a estabilidade da dobra, estabilidade em soro, resistência da proteína ou solubilidade em água, ou para reduzir a tendência à agregação, se necessário. Por exemplo, os resíduos de cisteína de ocorrência natural podem sofrer mutação para outros aminoácidos para impedir a formação de ponte de dissulfeto. Também é possível realizar mutação deliberada de outras posições de sequências de aminoácidos em cisteína, a fim de introduzir novos grupos reativos, por exemplo, para conjugação a outros compostos, tais como polietileno glicol (PEG), hidroxietil amido (HES), biotina, peptídeos ou proteínas, ou para a formação de ligações de dissulfeto não de ocorrência natural. A porção de tiol gerada pode ser utilizada para PEGilar ou HESilar a muteína, por exemplo, a fim de aumentar a meia vida em soro de uma muteína de lipocalina correspondente. As possibilidades exemplificativas de tal mutação para introduzir um resíduo de cisteína na sequência de aminoácidos de uma muteína de hTlc incluem as substituições Thr 40→ Cys, Glu 73→ Cys, Arg 90→ Cys, Asp 95→ Cys, e Glu 131→ Cys. A porção tiol gerada ao lado de qualquer uma das posições de aminoácidos 40, 73, 90, 95 e/ou 131 pode ser utilizada para PEGilar ou HESilar a muteína, por exemplo, a fim de aumentar a meia vida em soro de uma muteína hTlc correspondente.

[00121] Em algumas modalidades, se uma das porções químicas acima é conjugada com uma muteína de lipocalina da descrição, a conjugação a uma cadeia lateral de aminoácido pode ser vantajosa. As cadeias

laterais de aminoácido podem ocorrer naturalmente na sequência de aminoácidos de uma lipocalina humana ou podem ser introduzidas por mutagênese. No caso de um local de ligação adequado ser introduzido por meio de mutagênese, uma possibilidade é a substituição de um aminoácido na posição apropriada por um resíduo de cisteína. Por exemplo, tal mutação inclui pelo menos uma dentre a substituição de Thr 40→Cys, Glu 73→Cys, Arg 90→Cys, Asp 95→Cys ou Glu 131→Cys na sequência do tipo selvagem de lipocalina de lágrima humana. O resíduo de cisteína recém-criado em qualquer uma destas posições pode ser, então, utilizado para conjugar a muteína com a porção química que prolonga a meia-vida de soro da muteína, como PEG ou um derivado ativado do mesmo.

[00122] Em outra modalidade, a fim de fornecer cadeias laterais de aminoácido adequadas para conjugar um dos compostos acima com uma muteína de lipocalina de acordo com a presente descrição, os aminoácidos artificiais podem ser introduzidos por mutagênese. Em geral, tais aminoácidos artificiais são projetados para serem mais reativos e, desse modo, para facilitar a conjugação com o composto desejável. Um exemplo desse aminoácido artificial que pode ser introduzido por meio de tRNA artificial é para-acetilfenilalanina.

[00123] Para diversas aplicações das muteínas descritas no presente documento, pode ser conveniente utilizá-las na forma de proteínas de fusão. Em algumas modalidades, muteína de lipocalina da descrição é fundida no seu terminal N ou terminal C em uma proteína, domínio de proteína ou peptídeo, tal como uma sequência de sinal e/ou marca de afinidade.

[00124] As etiquetas de afinidade, como a etiqueta Strep ou etiqueta Strep II (Schmidt *et al.*, *J Mol Biol*, 1996), a etiqueta c-myc, a etiqueta FLAG, a etiqueta His ou a etiqueta HA ou proteínas, como glutationa-S-transferase, que permitem a detecção e/ou purificação fácil de proteínas

recombinantes, são exemplos adicionais de parceiros de fusão estáveis. Por fim, proteínas com propriedades cromogênicas ou fluorescentes, tais como a proteína fluorescente verde (GFP) ou a proteína fluorescente amarela (YFP) também são parceiros de fusão apropriados para mutoínas de lipocalina da descrição.

[00125] Geralmente, é possível marcar as mutoínas de lipocalina da descrição com qualquer substância química ou enzima apropriada, que gera, direta ou indiretamente, um sinal ou composto detectável em uma reação química, física, óptica ou enzimática. Um exemplo de uma reação física e, ao mesmo tempo, marcador/reAÇÃO óptica é a emissão de fluorescência mediante irradiação ou emissão de raios X ao utilizar-se uma marca radioativa. Fosfatase alcalina, peroxidase de rabanete silvestre e  $\beta$ -galactosidase são exemplos de marcas de enzimas (e, ao mesmo tempo, marcas ópticas) que catalisam a formação de produtos de reação cromogênicos. Geralmente, todas as marcas comumente utilizadas para anticorpos (exceto aquelas exclusivamente utilizadas com a porção de açúcar na parte Fc de imunoglobulinas) podem também ser utilizadas para conjugação às mutoínas de lipocalina da descrição. As mutoínas de lipocalina da descrição também podem ser conjugadas com qualquer agente terapeuticamente ativo adequado, por exemplo, para a entrega alvejada de tais agentes a uma dada célula, tecido ou órgão, ou para o alvejamento seletivo de células (por exemplo, células de tumor) sem afetar as células normais circundantes. Exemplos desses agentes terapeuticamente ativos incluem radionuclétos, toxinas, moléculas orgânicas pequenas e peptídeos terapêuticos (tais como peptídeos que agem como agonistas/antagonistas de um receptor da superfície celular ou peptídeos que concorrem por um local de ligação de proteínas sobre um dado alvo celular). As mutoínas de lipocalina da descrição podem, entretanto, também ser conjugadas a ácidos nucleicos terapeuticamente ativos, tais como moléculas de ácidos nucleicos antissenso, RNA pequenos

de interferência, micro RNA ou ribozimas. Esses conjugados podem ser produzidos por meio de métodos bem conhecidos na técnica.

[00126] Conforme indicado acima, mutoína de lipocalina da descrição pode, em algumas modalidades, ser conjugada a uma porção que prolonga a meia vida em soro da mutoína (neste sentido, vide também a Publicação de Patente Internacional n.º WO 2006/056464, na qual essas estratégias de conjugação são descritas com referência a mutoínas de lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos humanos (hNGAL) com afinidade de ligação para CTLA-4). A porção química que prolonga a meia-vida de soro pode ser uma molécula de polialquileno glicol, amido de hidroxietila, moléculas de ácido graxo, como ácido palmítico (Vajo e Duckworth, Pharmacol Rev, 2000), uma parte Fc de uma imunoglobulina, um domínio C<sub>H</sub>3 de uma imunoglobulina, um domínio C<sub>H</sub>4 de uma imunoglobulina, um peptídeo de ligação de albumina, ou uma proteína de ligação de albumina pode ser uma proteína de ligação de albumina bacteriana, um anticorpo, um fragmento de anticorpo incluindo anticorpos de domínio (por exemplo, Patente dos E.U.A. n.º 6.696.245), ou uma mutoína de lipocalina com atividade de ligação para albumina. Consequentemente, os parceiros de conjugação adequados para prolongar a meia-vida de uma mutoína de lipocalina da descrição incluem uma proteína de ligação de albumina, por exemplo, um domínio de ligação de albumina bacteriana, como uma proteína de estreptococos G (Konig e Skerra, J Immunol Methods, 1998). Outros exemplos de peptídeos de ligação de albumina que podem ser usados como parceiro de conjugação são, por exemplo, aqueles que têm uma sequência de consenso Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys, em que Xaa<sub>1</sub> é Asp, Asn, Ser, Thr, ou Trp; Xaa<sub>2</sub> é Asn, Gln, His, Ile, Leu, ou Lys; Xaa<sub>3</sub> é Ala, Asp, Phe, Trp, ou Tyr; e Xaa<sub>4</sub> é Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, ou Thr conforme descrito na Publicação de Patente dos E.U.A. n.º 20030069395 ou Dennis *et al.* (J Biol

Chem, 2002).

[00127] Em outras modalidades, a própria albumina (Osborn *et al.*, J Pharmacol Exp Ther, 2002) ou um fragmento biologicamente ativo de albumina pode ser utilizado como parceiro de conjugação de uma mutoéina de lipocalina da descrição. O termo "albumina" inclui todas as albuminas de mamíferos, tais como albumina de soro humano, albumina de soro bovino ou albumina de rato. A albumina ou seu fragmento pode ser produzido de forma recombinante conforme descrito na Patente dos E.U.A. n.º 5.728.553 ou nas Publicações de Patentes Europeias n.<sup>os</sup> EP0330451 e EP0361991. A albumina humana recombinante (por exemplo, Recombumin® de Novozymes Delta Ltd., Nottingham, UK) pode ser conjugada ou fundida com uma mutoéina de lipocalina da descrição a fim de prolongar a meia-vida da mutoéina.

[00128] Caso a proteína de ligação de albumina seja um fragmento de anticorpo, ele pode ser um anticorpo de domínio. Anticorpos de domínio (dAbs) são elaborados para permitir controle preciso sobre as propriedades biofísicas e meia vida *in vivo* para criar o perfil de produto de eficácia e segurança ideal. Anticorpos de domínio são, por exemplo, disponíveis comercialmente por meio da Domantis Ltd. (Cambridge, Reino Unido e MA, Estados Unidos).

[00129] Caso se utilize transferrina como porção para prolongar a meia vida em soro das mutoéinas de lipocalina da descrição, as mutoéinas podem ser geneticamente fundidas ao terminal N ou C, ou ambos, de transferrina não glicosilada. Transferrina não glicosilada possui meia vida de 14-17 dias e proteína de fusão de transferrina possuirá meia vida prolongada, de forma similar. A portadora de transferrina também fornece alta biodisponibilidade, biodistribuição e estabilidade de circulação. Esta tecnologia é disponível comercialmente por meio da BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, Estados Unidos). Transferrina humana recombinante (DeltaFerrin™) para uso como estabilizante

de proteínas/parceiro de prolongamento da meia vida também está disponível comercialmente por meio da Novozymes Delta Ltd. (Notttingham, Reino Unido).

[00130] Caso uma parte Fc de imunoglobulina seja utilizada para fins de prolongar a meia vida em soro das mureínas de lipocalina da descrição, pode-se utilizar a tecnologia SynFusion™, disponível comercialmente por meio da Syntonix Pharmaceuticals, Inc. (MA, Estados Unidos). O uso dessa tecnologia de fusão de Fc permite a criação de produtos biofarmacêuticos com ação mais longa e pode, por exemplo, consistir de duas cópias da mureína ligada à região Fc de um anticorpo para aprimorar a farmacocinética, a solubilidade e a eficiência de produção.

[00131] Ainda outra alternativa para prolongar a meia-vida das mureínas de lipocalina da descrição é a fusão, ao terminal N ou C de uma mureína, de sequências ricas em glicina longas, não estruturadas e flexíveis (por exemplo, poliglicina com cerca de 20 a 80 resíduos de glicina consecutivos). Esta abordagem divulgada na Publicação de Patente Internacional n.º WO 2007/038619, por exemplo, também foi denominada "rPEG" (PEG recombinante).

[00132] Caso se utilize PEG como parceiro de conjugação, o polialquileno glicol pode ser substituído, não substituído, linear ou ramificado. Ele pode também ser um derivado de polialquileno ativado. Os exemplos de compostos adequados são moléculas de PEG conforme descrito na Publicação de Patente Internacional n.º WO 99/64016, na Patente dos E.U.A. n.º 6.177.074, ou na Patente dos E.U.A. n.º 6.403.564 em relação ao interferon, ou conforme descrito para outras proteínas, como asparaginase modificada por PEG, PEG-adenosina deaminase (PEG-ADA) ou PEG-superóxido dismutase (Fuertges e Abuchowski, *Journal of Controlled Release*, 1990). O peso molecular desse polímero, tal como PEG, pode variar de cerca de 300 a cerca de 70.000 Dáltons, incluindo, por exemplo, polietileno glicol com peso molecular de cerca

de 10.000, cerca de 20.000, cerca de 30.000 ou cerca de 40.000 Dáltons. Além disso como, por exemplo, descrito nas Patentes dos E.U.A. n.<sup>os</sup> 6.500.930 ou 6.620.413, os oligômeros de carboidrato e os polímeros, como HES podem ser conjugados com uma mutoína da descrição com o propósito de prolongamento de meia-vida de soro.

[00133] Além disso, mutoína de lipocalina divulgada no presente documento pode ser fundida a uma porção pode fornecer novas características às mutoínas de lipocalina da descrição, tais como atividade enzimática ou afinidade de ligação para outros alvos. Exemplos de parceiros de fusão apropriados são fosfatase alcalina, peroxidase de rabanete silvestre, glutationa S-transferase, domínio de ligação de albumina de proteína G, proteína A, anticorpos ou fragmentos de anticorpos, domínios de oligomerização ou toxinas.

[00134] Particularmente, pode ser possível fundir uma mutoína de lipocalina divulgada no presente documento a um local ativo de enzima separado, de tal forma que os dois "componentes" da proteína de fusão resultante ajam juntos sobre um dado alvo terapêutico. O domínio de ligação da mutoína de lipocalina liga-se ao alvo causador de doenças, permitindo que o domínio de enzima elimine a função biológica do alvo.

[00135] A presente descrição também se refere a moléculas de ácidos nucleicos (DNA e RNA) que incluem sequências de nucleotídeos que codificam as mutoínas de lipocalina da descrição. Como a degeneração do código genético permite substituições de certos códons por outros códons que especificam o mesmo aminoácido, a descrição não se limita a uma molécula de ácido nucleico específica que codifica uma mutoína de lipocalina conforme descrito no presente documento, mas engloba todas as moléculas de ácidos nucleicos que incluem sequências de nucleotídeos que codificam uma mutoína funcional. Em relação a isso, a presente descrição fornece sequências de nucleotídeo que codificam algumas mutoínas de lipocalina da descrição conforme mostrado nas SEQ

ID NOs: 29 a 50, 71 a 84 e 96 a 106.

[00136] Em outra modalidade do método de acordo com a descrição, uma molécula de ácido nucleico que codifica uma hTlc é submetida primeiro à mutagênese em uma ou mais das posições de sequência de aminoácidos 5, 7–8, 10, 14, 16, 25–34, 44, 46, 52–53, 55–56, 58, 60–61, 63, 65–66, 69–70, 73, 79–80, 84–86, 89–90, 93, 96–98, 101, 105–106, 108, 110–114, 121, 124, 148–150, 152–154, e 157 da sequência de polipeptídeo linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1). Segundo, a molécula de ácido nucleico que codifica uma lipocalina de lágrima humana também é submetida à mutagênese em uma ou mais das posições de sequência de aminoácidos 101, 111, 114 e 153 da sequência de polipeptídeo linear da hTlc madura (SEQ ID NO:1).

[00137] A descrição também inclui moléculas de ácidos nucleicos que codificam as mutoínas de lipocalina da descrição, que incluem mutações adicionais fora das posições de sequência indicadas de mutagênese experimental. Essas mutações são frequentemente toleradas ou podem até ser vantajosas, por exemplo, se contribuírem para aprimoramento da eficiência de dobra, estabilidade em soro, estabilidade térmica, estabilidade da formulação ou afinidade de ligação de ligantes das mutoínas.

[00138] Uma molécula de ácido nucleico divulgada no presente pedido pode ser "ligada operativamente" a uma ou mais sequências reguladoras para permitir a expressão dessa molécula de ácido nucleico.

[00139] Uma molécula de ácido nucleico, tal como DNA, é denominada "capaz de expressar uma molécula de ácido nucleico" ou "capaz de permitir a expressão de uma sequência de nucleotídeos" se incluir elementos de sequências que contenham informações relativas à regulagem da transcrição e/ou da tradução e essas sequências são "operativamente ligadas" à sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo. Ligação operativa é uma ligação na qual os elementos de sequências reguladoras

e a sequência a ser expressa são conectados de forma que permita a expressão genética. A natureza precisa das regiões reguladoras necessárias para expressão de gene pode variar entre espécies, mas, em geral, estas regiões incluem um promotor, que, em procariotas, contêm tanto o promotor *per se*, isto é, elementos de DNA que direcionam a iniciação de transcrição, assim como elementos de DNA que, quando transcritos em RNA, sinalizarão a iniciação de tradução. Essas regiões promotoras normalmente incluem sequências não codificadoras 5' envolvidas no início de transcrição e tradução, tais como as caixas -35/-10 e o elemento de Shine-Dalgarno em procariotas ou a caixa TATA, sequências CAAT e elementos de cobertura 5' em eucariotas. Estas regiões podem também incluir elementos aprimoradores ou repressores, bem como sequências líderes e de sinal traduzidas para dirigir o polipeptídeo nativo a um compartimento específico de uma célula hospedeira.

[00140] Além disso, as sequências não codificadoras 3' podem conter elementos reguladores envolvidos no término de transcrição, poliadenilação ou similares. Se, entretanto, essas sequências de término não forem satisfatoriamente funcionais em células hospedeiras específicas, elas podem então ser substituídas por sinais funcionais naquela célula.

[00141] Moléculas de ácidos nucleicos da descrição podem, portanto, incluir uma sequência reguladora, tal como uma sequência promotora. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico da descrição inclui uma sequência promotora e uma sequência de terminação de transcrição. Promotores procarióticos apropriados são, por exemplo, o promotor *tet*, o promotor *lacUV5* ou o promotor T7. Exemplos de promotores úteis para expressão em células eucarióticas são o promotor SV40 ou o promotor CMV.

[00142] As moléculas de ácidos nucleicos da descrição podem também ser parte de um vetor ou qualquer outro tipo de veículo de clonagem, tal como plasmídeo, fagomídeo, fago, bacilovírus, cosmídeo ou

cromossomo artificial.

[00143] Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico é incluída em um fasmídeo. Vetor de fasmídeo indica um vetor que codifica a região intergênica de um fago de têmpora, tal como M13 ou f1, ou uma de suas partes funcionais, fundido ao cDNA de interesse. Após a superinfecção das células hospedeiras bacterianas com esse vetor de fagomídeo e um fago auxiliar apropriado (por exemplo, M13K07, VCS-M13 ou R408), são produzidas partículas de fagos intactas, de forma a permitir o acoplamento físico do cDNA heterólogo codificado ao seu polipeptídeo correspondente exibido sobre a superfície do fago (Lowman, Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1997, Rodi e Makowski, Curr Opin Biotechnol, 1999).

[00144] Esses veículos de clonagem podem incluir, além das sequências reguladoras descritas acima e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma muteína de lipocalina conforme descrito no presente, sequências de controle e reprodução derivadas de uma espécie compatível com a célula hospedeira que é utilizada para expressão, bem como marcadores de seleção que fornecem um fenótipo selecionável sobre células transformadas ou transfectadas. Grandes quantidades de vetores de clonagem apropriados são conhecidas na técnica e disponíveis comercialmente.

[00145] A molécula de DNA que codifica uma muteína de lipocalina conforme descrito no presente e, particularmente, um vetor de clonagem que contém a sequência de codificação dessa muteína podem ser transformados em uma célula hospedeira capaz de expressar o gene. Pode-se realizar transformação utilizando métodos padrão. A presente invenção também se refere, portanto, a uma célula hospedeira que contém uma molécula de ácido nucleico conforme descrito no presente.

[00146] As células hospedeiras transformadas são cultivadas sob condições apropriadas para expressão da sequência de nucleotídeos

que codifica uma proteína de fusão da descrição. Células hospedeiras apropriadas podem ser procarióticas, tais como *Escherichia coli* (*E. coli*) ou *Bacillus subtilis*, ou eucarióticas, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, células de insetos SF9 ou High5, linhagens de células de mamíferos imortalizadas (por exemplo, células HeLa ou células de CHO) ou células de mamíferos primárias.

[00147] A descrição também se refere a um método para a produção de uma muteína de lipocalina conforme descrito no presente documento, em que a muteína, um fragmento da muteína ou uma proteína de fusão da muteína e outro polipeptídeo (por exemplo, outra muteína de lipocalina ou anticorpo ou fragmento de anticorpo) é produzida a partir do ácido nucleico que codifica a muteína por meio de métodos de manipulação genética. O método pode ser conduzido *in vivo*, a muteína de lipocalina pode ser produzida, por exemplo, por um organismo hospedeiro bacteriano ou eucariótico e isolada em seguida desse organismo hospedeiro ou seu cultivo. Também é possível produzir proteínas *in vitro*, utilizando, por exemplo, um sistema de tradução *in vitro*.

[00148] Ao produzir a muteína de lipocalina *in vivo*, um ácido nucleico que codifica essa muteína é introduzido em um organismo hospedeiro eucariótico ou bacteriano apropriado por meio de tecnologia de DNA recombinante (conforme já descrito acima). Com este propósito, a célula hospedeira é transformada, em primeiro lugar, com um vetor de clonagem que inclui uma molécula de ácido nucleico que codifica uma muteína de lipocalina conforme descrito no presente documento, utilizando métodos padrão estabelecidos. A célula hospedeira é então cultivada sob condições que permitem a expressão do DNA heterólogo e, portanto, a síntese do polipeptídeo correspondente. Em seguida, o polipeptídeo é recuperado da célula ou do meio de cultivo.

[00149] Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico, tal como DNA, descrita no presente pedido pode ser "operativamente

"ligada" a outra molécula de ácido nucleico da descrição para permitir a expressão de uma proteína de fusão da descrição. Neste sentido, ligação operativa é uma ligação na qual os elementos de sequência da primeira molécula de ácido nucleico e os elementos de sequência da segunda molécula de ácido nucleico são conectados de forma que permita a expressão da proteína de fusão como um polipeptídeo isolado.

[00150] Além disso, em algumas modalidades de mureínas hTlc da descrição, a ligação de dissulfeto de ocorrência natural entre Cys 61 e Cys 153 pode ser removida. Consequentemente, essas mureínas podem ser produzidas em um compartimento celular que possui meio redox redutor, por exemplo, no citoplasma de bactérias Gram-negativas.

[00151] Caso uma mureína de lipocalina da descrição inclua ligações de dissulfeto intramoleculares, pode-se preferir dirigir o polipeptídeo nascente a um compartimento celular que possui meio redox oxidante, utilizando uma sequência de sinais apropriada. Esse ambiente oxidante pode ser fornecido pelo periplasma de bactérias Gram-negativas tais como *E. coli*, no meio extracelular de bactérias Gram-positivas ou no lúmen do retículo endoplasmático de células eucarióticas e normalmente favorece a formação de ligações de dissulfeto estruturais.

[00152] Também é possível, entretanto, produzir uma mureína da descrição no citosol de células hospedeiras, preferencialmente *E. coli*. Neste caso, o polipeptídeo pode ser obtido diretamente em estado solúvel e dobrado ou recuperado na forma de corpos de inclusão, seguido por renaturação *in vitro*. Uma opção adicional é o uso de linhagens hospedeiras específicas que possuem um meio intracelular oxidante, que pode, portanto, permitir a formação de ligações de dissulfeto no citosol (Venturi *et al.*, *J Mol Biol*, 2002).

[00153] Mureína de lipocalina conforme descrito no presente documento não pode, entretanto, ser necessariamente gerada ou produzida apenas utilizando engenharia genética. Ao contrário, essa mureína pode

também ser obtida por meio de síntese química, tal como síntese de polipeptídeos de fase sólida Merrifield ou por meio de transcrição e tradução *in vitro*. É possível, por exemplo, a identificação de mutações promissoras utilizando modelagem molecular, polipeptídeos que continuam essas mutações sintetizadas *in vitro* e a investigação para determinar a atividade de ligação com relação a LAG-3 e outras propriedades desejáveis (tais como estabilidade). Métodos de síntese de fase sólida e/ou fase de solução de polipeptídeos/proteínas são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Bruckdorfer *et al.*, *Curr Pharm Biotechnol*, 2004).

[00154] Em outra modalidade, as muteínas de lipocalina da descrição podem ser produzidas por meio de transcrição/tradução *in vitro* empregando métodos bem estabelecidos e conhecidos pelos técnicos no assunto.

[00155] Os técnicos na área apreciarão métodos úteis de preparação de muteínas de lipocalina contemplados na presente descrição, mas cujas sequências de proteínas ou de ácidos nucleicos não são explicitamente divulgadas no presente documento. De forma geral, essas modificações da sequência de aminoácidos incluem, por exemplo, mutagênese dirigida de posições de aminoácidos isoladas, a fim de simplificar a subclonagem de um gene de lipocalina que sofreu mutação ou suas partes, incorporando locais de clivagem para certas enzimas de restrição. Além disso, essas mutações podem também ser incorporadas para aumentar ainda mais a afinidade de muteína de lipocalina para seu alvo (por exemplo, LAG-3). Adicionalmente, podem ser introduzidas mutações para modular certas características da muteína, de forma a aprimorar a estabilidade de dobra, estabilidade em soro, resistência a proteínas ou solubilidade em água, ou para reduzir a tendência à agregação, se necessário. Por exemplo, os resíduos de cisteína de ocorrência natural podem sofrer mutação para outros aminoácidos para impedir a

formação de ponte de dissulfeto.

[00156] As muteínas de lipocalina divulgadas no presente documento e seus derivados podem ser utilizados em muitos campos similares a anticorpos ou seus fragmentos. Por exemplo, as muteínas de lipocalina podem ser utilizadas para marcação com uma enzima, anticorpo, substância radioativa ou qualquer outro grupo que possui atividade bioquímica ou características de ligação definidas. Ao fazê-lo, seus alvos correspondentes ou suas proteínas de fusão ou conjugados podem ser detectados ou colocados em contato com eles. Além disso, muteínas de lipocalina da descrição podem servir para detectar estruturas químicas por meio de métodos analíticos estabelecidos (por exemplo, ELISA ou Western Blot) ou por meio de microscopia ou imunossessóricos. Neste sentido, o sinal de detecção pode ser gerado diretamente pelo uso de um conjugado de muteína apropriado ou proteína de fusão, ou indiretamente por meio de detecção imunoquímica da muteína ligada por meio de anticorpo.

[00157] Objetos, vantagens e características adicionais desta descrição tornar-se-ão evidentes para os técnicos na área mediante exame dos Exemplos a seguir e das Figuras anexas, que não se destinam a ser limitadores. Dever-se-á compreender, portanto, que, embora a presente descrição seja especificamente divulgada por exemplos de modalidades e características opcionais, os técnicos na área podem recorrer a modificações e variações das revelações ali descritas e divulgadas no presente documento essas modificações e variações são consideradas dentro do escopo desta descrição.

[00158] A presente invenção pode ser adicionalmente caracterizada pelos itens a seguir:

Item 1. Muteína de lipocalina que tem capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por  $K_d$  de cerca de 250 nM ou menos.

Item 2. Muteína de lipocalina, de acordo com o item 1, em que a muteína tem capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por  $K_d$  de cerca de 50 nM ou menos.

Item 3. Muteína de lipocalina, de acordo com o item 1, em que a muteína tem capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por  $K_d$  de cerca de 3 nM ou menos.

Item 4. Muteína de lipocalina, de acordo com o item 1, em que a muteína tem capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por  $K_d$  de cerca de 0,1 nM ou menos.

Item 5. Muteína de lipocalina, de acordo com o item 1, em que a muteína tem capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por  $K_d$  de cerca de 0,05 nM ou menos.

Item 6. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 5, em que os valores de  $K_d$  são determinados por análise por ressonância de plasmon de superfície conforme essencialmente descrito no Exemplo 4.

Item 7. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 7, em que a muteína compreende pelo menos dois ou mais resíduos de aminoácido que sofreram mutação nas posições de sequência 5, 7–8, 10, 14, 16, 25–34, 44, 46, 52–53, 55–56, 58, 60–61, 63, 65–66, 69–70, 73, 79–80, 84–86, 89–90, 93, 96–98, 101, 105–106, 108, 110–114, 121, 124, 148–150, 152–154 e 156 e 157 da sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana (SEQ ID NO: 1).

Item 8. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 6, em que a muteína compreende pelo menos um resíduo de aminoácido que sofreu mutação nas posições de sequência 14, 25–26, 28, 31–32, 52, 55, 58, 66, 79, 84, 86, 101, 105–106, 108, 110, 112–114, e 121 da sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana (SEQ ID NO: 1).

Item 9. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer

um dos itens 1 a 7, em que a mutoína compreende adicionalmente pelo menos um ou mais resíduos de aminoácido que sofreram mutação nas posições de sequência 5, 7-8, 10, 16, 26-34, 44, 46, 53, 56, 58, 60-61, 63, 65-66, 69-70, 73, 79-80, 85, 89-90, 93, 96-98, 101, 105-106, 108, 110-111, 114, 121, 124, 148-150, 152-154, e 156-157 da sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana (SEQ ID NO: 1).

Item 10. Mutoína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 9, em que a mutoína compreende pelo menos um ou mais resíduos de aminoácido que sofreram mutação nas posições de sequência 5, 7-8, 10, 16, 44, 46, 63, 65, 69-70, 73, 80, 84, 89-90, 93, 96-98, 113, 124, 148-150, 152, 154, e 156-157 da sequência de polipeptídeos linear de hTlc (SEQ ID NO: 1).

Item 11. A mutoína de lipocalina do item 7, em que a sequência de aminoácidos da mutoína compreende dois ou mais dos resíduos de aminoácido que sofreram mutação em comparação com a sequência de polipeptídeo linear de lipocalina de lágrima humana (SEQ ID NO: 1): Ala 5 → Thr; Asp 7 → Gly; Glu 8 → Gln; Ile 10 → Phe; Ser 14 → Pro; Thr 16 → Met; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser, Asp, Glu, Ala, ou Gly; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys ou Asp; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile ou Leu; Asn 32 → Asp, Met ou Thr; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 44 → His; Gly 46 → Asp; Lys 52 → Arg; Val 53 → Ala; Met 55 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe ou Asp; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Ala 66 → Asn; Glu 69 → Gly; Lys 70 → Arg; Glu 73 → Ala; Ala 79 → Thr ou Glu; Asp 80 → Gly; His 84 → Tyr ou Leu; Val 85 → Ala ou Asp; Ala 86 → Asp; Ile 89 → Ser ou Asn; Arg 90 → Ser; Val 93 → Glu; His 96 → Asn; Tyr 97 → His; Ile 98 → Val; Cys 101 → Ser ou Phe; Leu 105 → Cys ou Gly; His 106 → Ala, Gln, Glu, Lys, ou Pro; Lys 108 → Tyr ou Thr; Val 110 → Gly ou Asn; Arg 111 → Pro; Gly 112 → Met, Val, ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu; Lys 114 → Trp ou Ala; Lys 121 → Thr; Leu 124 → Gln; Arg 148 → Trp; Gln

149 → Leu; Ser 150 → Gly; Thr 152 → Pro; Cys 153 → Ser; Ser 154 → Ala; inserção de Pro entre as posições 156 e 157.

Item 12. Muteína de lipocalina, de acordo com o item 7, em que a sequência de aminoácidos da muteína compreende pelo menos um dos seguintes resíduos de aminoácidos que sofreram mutação em comparação com a sequência de polipeptídios linear de lipocalina lacrimal humana (SEQ ID NO: 1): Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser, Asp, Glu, Ala, ou Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Met ou Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr ou Leu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln, Glu, Lys, ou Pro; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly ou Asn; Gly 112 → Met, Val, ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr.

Item 13. Muteína de lipocalina, de acordo com o item 7, em que a sequência de aminoácidos da muteína compreende pelo menos um dos seguintes resíduos de aminoácidos que sofreram mutação em comparação com a sequência de polipeptídios linear de lipocalina lacrimal humana (SEQ ID NO: 1): Ala 5 → Thr; Asp 7 → Gly; Glu 8 → Gln; Ile 10 → Phe; Thr 16 → Met; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 44 → His; Gly 46 → Asp; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Lys 70 → Arg; Glu 73 → Ala; Ala 79 → Thr; Asp 80 → Gly; Val 85 → Ala ou Asp; Ile 89 → Ser ou Asn; Arg 90 → Ser; Val 93 → Glu; His 96 → Asn; Tyr 97 → His; Ile 98 → Val; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Leu 124 → Gln; Arg 148 → Trp; Gln 149 → Leu; Ser 150 → Gly; Thr 152 → Pro; Cys 153 → Ser; Ser 154 → Ala; inserção de Pro entre as posições 156 e 157.

Item 14. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer

um dos itens 1 a 13, em que a muteína de lipocalina se liga a LAG-3 com um valor de EC<sub>50</sub> de cerca de 320 nM ou menos.

Item 15. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 14, em que a muteína de lipocalina se liga a LAG-3 com um valor de EC<sub>50</sub> de cerca de 10 nM ou menos.

Item 16. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 14, em que a muteína de lipocalina se liga a LAG-3 com um valor de EC<sub>50</sub> de cerca de 0,2 nM ou menos.

Item 17. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 14 a 16, em que os ditos valores de EC<sub>50</sub> são medidos por separação de células ativadas por fluorescência, conforme essencialmente descrito no Exemplo 5.

Item 18. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 17, em que a muteína sofre reação cruzada tanto com LAG-3 humano quanto LAG-3 cinomolgo (SEQ ID NO: 1).

Item 19. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 18, em que a muteína tem capacidade para interferir na ligação de LAG-3 humano a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II.

Item 20. Muteína de lipocalina, de acordo com o item 19, em que a capacidade para interferir na ligação de LAG-3 humano a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II é analisada por separação de células ativadas por fluorescência, conforme essencialmente descrito no Exemplo 6.

Item 21. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 20, em que a sequência de aminoácidos da muteína compreende as seguintes mutações de aminoácido: Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His

106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; e uma ou mais dentre as seguintes mutações de aminoácido: Ala 5 → Thr; Asp 7 → Gly; Glu 8 → Gln; Ile 10 → Phe; Thr 16 → Met; Leu 44 → His; Gly 46 → Asp; Val 53 → Ala; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Lys 70 → Arg; Glu 73 → Ala; Ala 79 → Thr; Asp 80 → Gly; Val 85 → Ala ou Asp; Ile 89 → Ser ou Asn; Arg 90 → Ser; Val 93 → Glu; His 96 → Asn; Tyr 97 → His; Ile 98 → Val; Leu 124 → Gln; Arg 148 → Trp; Gln 149 → Leu; Ser 150 → Gly; Thr 152 → Pro; Ser 154 → Ala; inserção de Pro entre as posições 156 e 157.

Item 22. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 20, em que a sequência de aminoácidos da muteína compreende as seguintes mutações de aminoácido: Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Phe 28 → Asp; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; e uma ou mais dentre as seguintes mutações de aminoácido: Arg 26 → Ser, Asp, Glu, ou Ala; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; Leu 56 → Asp; His 84 → Tyr ou Leu; His 106 → Glu, Lys, ou Pro; Val 110 → Asn; Gly 112 → Val ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu.

Item 23. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22, em que a sequência de aminoácidos da muteína compreende um dos seguintes conjuntos de mutações de aminoácido:

(a) Ala 5 → Thr; Glu 8 → Gln; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; Ser 154 → Ala; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;

(b) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys;

Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Gly; Cys 153 → Ser; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;

(c) Asp 7 → Gly; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Arg 148 → Trp; Thr 152 → Pro; Cys 153 → Ser; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;

(d) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Ala 79 → Thr; Tyr 97 → His; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;

(e) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Val 85 → Asp; Arg 90 → Ser; His 96 → Asn; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Leu 124 → Gln; Cys 153 → Ser;

(f) Thr 16 → Met; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 44 → His; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Ile 89 → Ser; Cys 101 → Ser; Leu

105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(g) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Gln 149 → Leu; Cys 153 → Ser; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;

(h) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Lys 70 → Arg; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(i) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Asp 80 → Gly; Ile 89 → Asn; Ile 98 → Val; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;

(j) Ile 10 → Phe; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Glu 73 → Ala; Ile 89 → Asn; Val 93 → Glu; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(k) Ala 5 → Thr; Glu 8 → Gln; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Val 85 → Ala; Cys 101

→ Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; Ser 154 → Ala; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;

(l) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(m) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(n) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(o) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Glu; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Val; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(p) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Leu; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(q) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 →

Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(r) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ala; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Lys; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(s) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Asn; Gly 112 → Met; Val 113 → Ala; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(t) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Pro; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(u) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Leu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Val 113 → Leu; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; ou

(v) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Met; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr.

Item 24. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22, em que a sequência de aminoácidos da muteína

compreende um dos seguintes conjuntos de mutações de aminoácido:

- (a) Ala 5 → Thr; Glu 8 → Gln; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Val 85 → Ala; Ser 154 → Ala; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;
- (b) Ala 5 → Thr; Gly 46 → Asp; Lys 65 → Glu; Val 85 → Ala; Ser 150 → Gly; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;
- (c) Asp 7 → Gly; Val 85 → Asp; Arg 148 → Trp; Thr 152 → Pro; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;
- (d) Ala 5 → Thr; Val 53 → Ala; Lys 65 → Glu; Ala 79 → Thr; Tyr 97 → His; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;
- (e) Glu 63 → Asp; Val 85 → Asp; Arg 90 → Ser; His 96 → Asn; Leu 124 → Gln;
- (f) Thr 16 → Met; Leu 44 → His; Lys 65 → Glu; Ile 89 → Ser;
- (g) Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Gln 149 → Leu; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;
- (h) Lys 65 → Glu; Lys 70 → Arg;
- (i) Ala 5 → Thr; Lys 65 → Glu; Asp 80 → Gly; Ile 89 → Asn; Ile 98 → Val; inserção de Pro entre as posições 156 e 157;
- (j) Ile 10 → Phe; Lys 65 → Glu; Glu 73 → Ala; Ile 89 → Asn; Val 93 → Glu;
- (k) Arg 26 → Asp; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met;
- (l) Arg 26 → Glu; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met;
- (m) Arg 26 → Glu; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Glu; Gly 112 → Val;
- (n) Arg 26 → Asp; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; Gly 112 → Leu;
- (o) Arg 26 → Ser; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met;
- (p) Arg 26 → Ala; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Lys;

Val 110 → Gly; Gly 112 → Met;

- (q) Asn 32 → Thr; His 106 → Gln; Val 110 → Asn; Gly 112 → Met; Val 113 → Ala;
- (r) Arg 26 → Gly; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Pro; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; ou
- (s) Arg 26 → Asp; Asn 32 → Thr; His 84 → Leu; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Val 113 → Leu.

Item 25. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 24, em que a muteína compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 8 a 18 e 20 a 28 ou de um fragmento ou variante da mesma.

Item 26. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 25, em que a muteína tem pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97,5% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste nas SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 8 a 18 e 20 a 28.

Item 27. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 26, em que a muteína é conjugada a um composto selecionado dentre o grupo que consiste em uma molécula orgânica, uma marcação de enzima, uma marcação radioativa, uma marcação colorida, uma marcação fluorescente, uma marcação cromogênica, uma marcação luminescente, um hapteno, digoxigenina, biotina, um agente citostático, uma toxina, um complexo metálico, um metal e ouro coloidal.

Item 28. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 27, em que a muteína é fundida em sua terminação N e/ou sua terminação C a um parceiro de fusão que é uma proteína, um domínio de proteína ou um peptídeo.

Item 29. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer

um dos itens 1 a 28, em que a muteína é fundida em sua terminação N e/ou sua terminação C a um parceiro de fusão que é um anticorpo ou um fragmento de anticorpo.

Item 30. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 29, em que a muteína é conjugada a um composto que prolonga a meia-vida sérica da muteína.

Item 31. Muteína de lipocalina, de acordo com o item 30, em que o composto que prolonga a meia-vida sérica é selecionado dentre o grupo que consiste em uma molécula de polialquíleno glicol, hidro-etylamido, uma parte Fc de uma imunoglobulina, um domínio C<sub>H</sub>3 de uma imunoglobulina, um domínio C<sub>H</sub>4 de uma imunoglobulina, um peptídeo de ligação a albumina e uma proteína de ligação a albumina.

Item 32. Muteína de lipocalina, de acordo com o item 31, em que a molécula de polialquíleno glicol é polietileno (PEG) ou um derivado ativado do mesmo.

Item 33. Molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32.

Item 34. Vetor de expressão que compreende a molécula de ácido nucleico, de acordo com o item 33.

Item 35. Célula hospedeira que contém uma molécula de ácido nucleico, de acordo com o item 34.

Item 36. Método para produzir uma muteína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, em que a muteína é produzida a partir do ácido nucleico que codifica a muteína ou fragmento da mesma por meio de métodos de engenharia genética.

Item 37. Método para ligar LAG-3 em um indivíduo que compreende aplicar uma ou mais muteínas de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, ou uma ou mais composições que compreendem tais muteínas.

Item 38. Método para estimular a resposta imunológica em um indivíduo que compreende aplicar uma ou mais mutoínas de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, ou uma ou mais composições que compreendem tais mutoínas.

Item 39. Método para induzir proliferação de linfócitos T em um indivíduo que compreende aplicar uma ou mais mutoínas de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, ou uma ou mais composições que compreendem tais mutoínas.

Item 40. Método para interferir na ligação de LAG-3 humana a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II em um indivíduo que compreende aplicar uma ou mais mutoínas de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, ou uma ou mais composições que compreendem tais mutoínas.

Item 41. Mutoína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, em que a mutoína compete com a ligação de LAG-3 humana a células que expressam complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II.

Item 42. Mutoína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, em que a mutoína compete com a ligação de LAG-3 humano a células que expressam complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II, quando medida em uma análise de separação de células ativadas por fluorescência, conforme essencialmente descrito no Exemplo 6.

Item 43. Composição farmacêutica que compreende uma mutoína de lipocalina, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Item 44. Imunoconjunto ou proteína de fusão que compreende as mutoínas de lipocalina, ou fragmento das mesmas, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, ligados a um agente terapêutico.

Item 45. Uso de uma muteína, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, para a ligação/detecção de LAG-3 que compreende:

- (a) colocar a muteína em contato com uma amostra de teste suspeita de conter LAG-3, permitindo, assim, a formação de um complexo entre a muteína e LAG-3; e
- (b) detectar o complexo entre a muteína e LAG-3 por um sinal adequado.

Item 46. Kit diagnóstico ou analítico que compreende uma muteína, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32.

Item 47. Método para detectar a presença de LAG-3 em uma amostra biológica, em que o método compreende colocar a amostra em contato com uma muteína, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 32, sob condições que permitem a formação de um complexo de muteína e LAG-3.

Item 48. Método, de acordo com o item 47, que compreende, ainda, detectar o complexo da muteína e LAG-3.

Item 49. Método, de acordo com o item 47 ou 48, a amostra biológica é isolada de um ser humano.

Item 50. Método, de acordo com qualquer um dos itens 47 a 49, em que a amostra compreende fluido corporal.

## **V. EXEMPLOS**

### **Exemplo 1: Geração de bibliotecas de maturação e seleção de muteínas otimizadas que se ligam especificamente a LAG-3**

[00159] Para a otimização de muteínas específicas de LAG-3, as bibliotecas foram geradas com base nas SEQ ID NOs de muteína: 7 ou 19 com o uso de uma aleatorização desviada de posições selecionadas ou métodos com base em reação em cadeia da polimerase (PCR) propensa ao erro. O projeto desviado foi feito de modo que para cada uma das posições selecionadas o aminoácido codificado corresponda ao aminoácido encontrado no respectivo clone mãe com uma probabilidade de 50 a 70%,

enquanto o mesmo pode ser um aminoácido diferente com uma probabilidade de 50 a 30%. Com N como o número de posições alvejadas e B como desvio, o número mais provável de trocas por clone é  $N \times (1-B)$ .

[00160] As muteínas de lipocalina geradas foram clonadas com alta eficácia em vetor de fagomídeo essencialmente conforme descrito (Kim *et al.*, J Am Chem Soc, 2009). A exibição de fago foi empregue para selecionar para muteínas otimizadas com estabilidade térmica melhorada e afinidade de ligação. A seleção de fagomídeo foi conduzida com estringência aumentada em comparação com as seleções de muteína iniciais e etapas de pré-incubação envolvidas em temperatura elevada e concentração alvo limitante entre outras coisas.

**Exemplo 2: Identificação de muteínas que se ligam especificamente a LAG-3 com o uso de triagem de ELISA de alta produtividade**

[00161] As colônias individuais foram usadas para inocular 2x de meio de Trypton de Extrato de Levedura (2XYT)/Amp e cultivadas de um dia para o outro (14 a 18 h) para fase estacionária. Em seguida, 50 µl de 2xYT/Amp foram inoculados a partir dos cultivos em fase estacionária, incubados por três horas a 37ºC e alterados em seguida para 22ºC até atingir-se OD<sub>595</sub> de 0,6-0,8. A produção de muteínas foi induzida pela adição de 10 µl de 2xYT/Amp suplementado com 1,2 µg/ml de anidrotetraciclina. Os cultivos foram incubados a 22ºC até o dia seguinte. Após adição de 40 µl de 5% (p/v) BSA em PBS/T e incubação por uma hora a 25ºC, os cultivos estavam prontos para uso em testes de seleção.

[00162] Os formatos de triagem reversa foram aplicados, em que as muteínas foram capturadas por meio da etiqueta Strep em placas de microtítulo revestidas com anticorpo de etiqueta anti-Strep e LAG-3-Fc biotinilado foi adicionado e detectado por meio de Extravidina-peroxidase de rábano silvestre (HRP) (Sigma).

[00163] Para selecionar muteínas com afinidade e estabilidade aumentadas, a triagem foi realizada com i) concentração de antígeno reduzida, ii) com o uso de formatos de triagem reversa em que as muteínas foram capturadas por meio da etiqueta Strep em placas de microtípulo revestidas com anticorpo de etiqueta anti-Strep e concentrações diferentes do alvo foram adicionadas e detectadas por meio de Extravidina-HRP (Sigma) e parcialmente iii) incubação do sobrenadante de triagem a 75°C antes da adição à placa-alvo.

[00164] Os clones foram, então, sequenciados com base nos resultados de triagem, e as muteínas foram selecionadas para caracterização adicional.

### **Exemplo 3: Expressão de muteínas**

[00165] As muteínas selecionadas com sequência C-terminal SAW-SHPQFEK de ligante SA e o peptídeo de etiqueta Strep II (WSHPQFEK) foram expressas em *E. coli* em meio 2XYT/Amp para purificar as muteínas após a expressão com o uso de cromatografia de afinidade Strep-Tactina e cromatografia de exclusão de tamanho preparativa (SEC). Após a purificação de SEC, as frações que contêm proteína monomérica são agrupadas e analisadas novamente com o uso de SEC analítica. O rendimento das muteínas de lipocalina após a cromatografia de afinidade de Strep-Tactina e cromatografia de exclusão de tamanho preparativa (SEC) é mostrado na **Tabela 1** assim como o teor de monômero das muteínas de lipocalina após a purificação de Strep-Tactina:

**Tabela 1:** Expressão de muteínas

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Rendimento [mg/L]</b>	<b>Teor de monômero (avaliado por SEC analítica) [%]</b>
85	4,03	100
86	8,33	100
87	10,79	100
88	10,63	94

89	9,56	89,6
90	10,40	89,9
91	9,96	95
92	8,75	98,9
93	10,26	92,6
94	10,15	91,3
20	7,53	95
21	8,40	96
22	7,86	95
23	7,28	89
24	7,14	92
25	7,38	92
26	8,74	93
27	8,84	97
28	8,04	97
57	0,38	100
61	0,96	100
63	2,26	100
64	0,64	100
65	5,85	100
66	2,20	100
67	0,69	100
68	8,29	100

**Exemplo 4: Afinidade de ligação de muteínas com LAG-3 humano e cinomolgo determinada pela ressonância de plasmon de superfície (SPR)**

[00166] Utilizou-se ressonância de plasmon de superfície (SPR) para medir a cinética de ligação e a afinidade das muteínas de lipocalina representativas divulgadas no presente documento.

[00167] A ligação de mureínas de lipocalina exemplificativas a huLAG-3-Fc (R&D Systems) e cyLAG-3-Fc foi determinada por Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) com o uso de um instrumento Biacore T200 (GE Healthcare). LAG-3 recombinante de macacos cinomolgos (cyLAG-3-Fc) foi produzido fundindo-se o domínio extracelular de LAG-3 cinomolgo (cyLAG-3) ao fragmento Fc de IgG1 humana por meio de um sítio de clivagem de Fator Xa e um ligante (G4S)<sub>3</sub>.

[00168] O anticorpo Fc anti-IgG humano (GE Healthcare) foi imobilizado sobre um chip sensor CM5 utilizando química de amina padrão: os grupos carboxila sobre o chip foram ativados utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodi-imida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS). Subsequentemente, a solução de anticorpo Fc de IgG anti-humana (GE Healthcare) a uma concentração de 25 µg/ml em acetato de sódio 10 mM (pH) 5 foi aplicada a uma taxa de fluxo de 5 µl/min até um nível de imobilização de 9.000 a 14.000 unidades de ressonância (RU) ter sido alcançado. Ésteres de NHS não reagidos residuais foram bloqueados por meio de passagem de uma solução de 1 M de etanolamina ao longo da superfície. O canal de referência foi tratado de forma análoga. Subsequentemente, huLAG-3-Fc a 0,25 µg/ml ou cyLAG-3-Fc a 1,5 µg/ml em tampão HBS-EP+ foi capturado pelo anticorpo de IgG-Fc anti-humano na superfície de chip por 180 s a uma taxa de fluxo de 10 µl/min.

[00169] Para a determinação de afinidade, as diluições de cada mureína foram preparadas em tampão HBS-EP+ e aplicadas à superfície de chip preparada. Para as SEQ ID NOs: 19 a 28 as concentrações de 100nM a 4nM e em alguns casos até 0,8nM foram aplicadas e para as SEQ ID NOs: 7 e 85 a 94 as concentrações de 6 nM até 0,5 nM foram aplicadas para medição de afinidade para LAG-3 humano e 8 nM a 0,5 nM para medição de afinidade com LAG-3 cinomolgo. O ensaio de ligação foi executado com um tempo de contato de 180 s, um tempo de dissociação de 1500 ou 600 s e uma taxa de fluxo de 30 µl/min. Todas

as medições foram realizadas a 25°C. A regeneração da superfície de chip foi alcançada com injeções de MgCl<sub>2</sub> 3 M por 60 s e glicina-HCl 10 mM (pH 1,7) por 180 s a uma taxa de fluxo de 10 µl/min seguida por uma lavagem extra com tampão de teste (HBS-EP+ tampão) e um período de estabilização de 120 s. A muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 3 também foi testada como controle negativo. Antes das medições de proteína, três ciclos de partida foram realizados com propósitos de condicionamento. Os dados foram avaliados com software de Avaliação Biacore T200 (v2.0). Utilizou-se referência dupla e o modelo de ligação 1:1 foi utilizado para enquadrar os dados brutos.

[00170] Os valores determinados para  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  e a constante de dissociação de equilíbrio resultante ( $K_d$ ) para as SEQ ID NOs: 7 e 19, e as muteínas de lipocalina otimizadas das SEQ ID NOs: 85 a 94, 20 a 28, 57, 61 e 63 a 68 são resumidas na **Tabela 2**. Todas as muteínas de lipocalina específicas de LAG-3 otimizadas se ligam a LAG-3 humano e também cinomolgo com afinidade picomolar para baixa afinidade nanomolar e afinidades até 60 vezes melhoradas após a otimização.

[00171] Tabela 2: As constantes cinéticas e as afinidades de muteínas específicas de LAG-3 determinadas por ressonância de plasmon de superfície (SPR).

SEQ ID NO:	LAG-3 humano			LAG-3 cinomolgo		
	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_d$ [nM]	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_d$ [nM]
7	5,86E+06	1,89E-03	0,32	2,29E+06	1,81E-01	78,99
85	5,30E+06	2,80E-04	0,053	4,62E+06	6,21E-03	1,35
86	4,78E+06	3,70E-04	0,077	4,44E+06	1,11E-02	2,51
87	5,85E+06	5,08E-04	0,087	4,27E+06	1,77E-02	4,15
88	5,81E+06	2,88E-04	0,05	4,83E+06	5,55E-03	1,15
89	4,93E+06	4,67E-04	0,095	4,39E+06	1,88E-02	4,281
90	4,75E+06	6,18E-04	0,13	7,74E+06	5,82E-02	7,517
91	5,56E+06	6,62E-04	0,119	7,78E+06	5,33E-02	6,856
92	5,54E+06	8,09E-04	0,146	4,63E+07	4,94E-01	10,681
93	4,41E+06	4,63E-04	0,105	5,22E+06	1,98E-02	3,789
94	4,87E+06	7,00E-04	0,144	2,47E+07	2,12E-01	8,605
19	2,62E+05	7,18E-04	2,741	2,24E+05	6,74E-04	3,012

20	1,88E+05	1,35E-04	0,722	1,63E+05	7,51E-05	0,461
21	1,57E+05	1,13E-04	0,718	1,42E+05	6,62E-05	0,467
22	2,34E+05	1,45E-04	0,619	1,80E+05	9,14E-05	0,507
23	1,58E+05	1,05E-04	0,668	1,22E+05	7,16E-05	0,589
24	2,07E+05	1,40E-04	0,676	1,42E+05	1,17E-04	0,826
25	1,10E+05	1,42E-04	1,29	1,03E+05	1,19E-04	1,161
26	1,01E+05	1,38E-04	1,366	9,41E+04	1,36E-04	1,45
27	1,21E+05	1,74E-04	1,439	1,22E+05	2,41E-04	1,97
28	4,63E+05	4,09E-04	0,883	2,36E+05	4,01E-04	1,7
57	2,21E+06	5,81E-05	0,026	1,98E+06	1,89E-03	0,954
61	1,61E+07	1,90E-03	0,118	6,25E+06	1,28E-02	2,04
63	6,59E+07	7,22E-03	0,11	1,38E+07	2,56E-02	1,85
64	3,34E+07	7,85E-03	0,235	1,13E+07	8,16E-02	7,24
65	2,58E+07	5,01E-03	0,195	1,46E+07	6,41E-02	4,39
66	7,05E+07	5,59E-03	0,0793	2,01E+07	2,42E-02	1,2
67	2,43E+07	5,16E-03	0,213	1,08E+07	5,53E-02	5,13
68	3,25E+07	5,15E-03	0,158	2,01E+07	4,33E-02	2,15

**Exemplo 5: Análise de separação de célula ativada por fluorescência (FACS) de miteínas de lipocalina que se ligam a células que expressam LAG-3 humano e cinomolgo**

[00172] Foram empregues estudos de separação de células ativadas por fluorescência (FACS) a fim de avaliar a ligação específica de miteínas de lipocalina SEQ ID NOs: 7, 19 a 28 e 85 a 94 para células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas de modo estável com huLAG-3 (CHO-huLAG-3) ou cyLAG-3 (CHO-cyLAG-3). SEQ ID NO: 3 foi testada em paralelo como controle negativo. As linhagens celulares foram geradas com o uso do sistema Flp-In (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Células de CHO Flp-In com transfecção falsa serviram de controle negativo.

[00173] Células CHO transfectadas foram mantidas em meio F12 de Ham (Invitrogen) suplementado com soro de feto de bezerro a 10% (FCS, Biochrom) e 500 µg/ml de Higromicina B (Roth). As células foram cultivadas em frascos de cultivo celular sob condições padrão de acordo com as instruções do fabricante (37 °C, atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%). A fim de dissociar as células aderentes para subcultivo ou experimentos de

FACS, empregou-se Accutase (PAA) de acordo com as instruções do fabricante.

[00174] Para realizar o experimento, as células de CHO Flp-In negativas e LAG-3 positivas foram incubadas com muteínas de lipocalina, e a muteína ligada foi marcada com o uso de anticorpos anti-hTlc marcados de modo fluorescente, e, então, o sinal foi detectado com o uso de análise de FACS conforme descrito neste exemplo.

[00175]  $5 \times 10^4$  células por cavidade foram previamente incubadas por uma hora em PBS resfriado com gelo contendo soro de feto de bezerro a 5% (PBS-FCS). Subsequentemente, uma série de diluição de muteínas de lipocalina, a muteína de lipocalina de controle negativo (SEQ ID NO: 3) e um anticorpo anti-LAG-3 de bancada (SEQ ID NOs: 5 e 6) tipicamente na faixa de 1  $\mu$ M a 0,01 nM, foi adicionada às células e incubada em gelo por 1 h. As células foram lavadas duas vezes em PBS gelado com o uso de centrifugação a 500 xg e, então, incubada com um anticorpo anti-lipocalina de coelho marcado com o corante fluorescente Alexa 488 (Pieris) ou um anticorpo de IgG anti-humana de cabra marcado com Alexa 488 (Invitrogen) por 30 min em gelo. As células foram subsequentemente lavadas e analisadas com o uso de um citotômetro de Fluxo intellicyt IQue (Intellicyt). Os dados fluorescentes gerados por ligação de muteína de lipocalina a células que expressam LAG-3 foram analisados por injeção para células de CHO que expressam LAG-3 e com o uso de software Forecyt® e a média fluorescente geométrica resultante foram plotados e ajustados com o uso de software Graphpad. Os dados gerados para as SEQ ID NOs: 7, 19 a 28 e 85 a 94 são mostrados na **Figura 2** e na **Tabela 3**. Todas as muteínas específicas de LAG-3 otimizadas (SEQ ID NOs: 85 a 94 e 20 a 28) mostram ligação clara a células de CHO que expressam huLAG-3 ou cyLAG-3, com EC<sub>50</sub> comparável ao anticorpo de bancada. A maior parte das muteínas otimizadas exibe valores de EC<sub>50</sub> mais baixos em comparação com as

SEQ ID NOs: 7 e 19, que indicam ligação melhorada em comparação com as muteínas de lipocalina parentais. As diferenças entre as afinidades de ligação e LAG-3 humano e cinomolgo, foram significativamente reduzidas para a maioria das muteínas otimizadas, o que representa um recurso preferencial para eventuais estudos farmacocinéticos ou de segurança de fármaco. A muteína de lipocalina de controle negativo (SEQ ID NO: 3), que não se liga a LAG-3, não mostrou qualquer ligação (não mostrado). Nenhuma ligação das muteínas de lipocalina foi detectada sobre células de CHO Flp-In com transfecção falsa (não exibidas).

[00176] **Tabela 3.** Ligação de muteínas de lipocalina específicas de LAG-3 e a molécula de referência (anticorpo anti-LAG-3 de bancada, SEQ ID NOs: 5 e 6) a células de CHO transfectadas com huLAG-3 ou LAG cinomolgo.

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>EC<sub>50</sub> [nM]</b> CHO::LAG-3 humano	<b>EC<sub>50</sub> [nM]</b> CHO::LAG-3 cinomolgo
7	1,33	319,3
85	0,22	9,8
86	1,52	21,16
87	0,95	21,05
88	0,18	9,3
89	0,85	41,73
90	0,02	103,4
91	0,61	74,27
92	0,76	111,3
93	0,69	42,68
94	0,53	117,4
19	4,09	26,2
20	1,97	29,84
21	2,52	31,59

22	2,23	33,06
23	3,04	33,61
24	2,35	34,93
25	2,55	38,93
26	2,23	44,97
27	2,15	31,37
28	2,19	21,04
5 e 6	0,5	46,8

**Exemplo 6: Análise de FACS de ligação competitiva de muteínas de lipocalina para LAG-3 humana com células que expressam MHC da classe II.**

[00177] Para determinar se uma dada muteína de lipocalina interfere com a ligação de LAG-3 a MHC da classe II sobre células positivas para MHC da classe II, utilizou-se um experimento de FACS de competição. Neste experimento, uma concentração constante de fusão de LAG-3-Fc humano (huLAG-3-Fc, R&D system) e uma série de diluição de cada muteína de lipocalina foi incubada com a linhagem celular humana positiva A375 de MHC da classe II, e huLAG-3-Fc ligado à célula foi detectado com o uso de um anticorpo de Fc anti-IgG marcado de modo fluorescente. Nesse ensaio, as muteínas de lipocalina competitivas interferentes com a ligação de huLAG-3 com seu MHC da classe II de ligante levam a uma redução de ligação de huLAG-3-Fc à linhagem celular positiva A375 de MHC da classe II.

[00178] A linhagem de células de melanoma A375 foi mantida em meio DMEM (Invitrogen) suplementado com soro de feto de bezerro a 10% (FCS, Biochrom). As células foram cultivadas em frascos de cultivo celular sob condições padrão de acordo com as instruções do fabricante (37°C, atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%). A fim de dissociar as células aderentes para subcultivo ou experimentos de FACS, empregou-se Accutase (PAA Laboratories GmbH) de acordo com as instruções do fabricante.

[00179] Para o ensaio de FACS,  $5 \times 10^4$  células de A375 por poço foram incubadas por 1 h em PBS-FCS, seguidas pela adição de huLAG-3-Fc 3 nM e concentrações variáveis das mureínas de lipocalina específicas de LAG-3, na faixa de 1  $\mu$ M a 0,01 nM. As células foram lavadas duas vezes em PBS gelado, ressuspensas em PBS-FCS e incubadas 30 min em gelo com anticorpo Fc de IgG anti-humano marcado com ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch). As células foram subsequentemente lavadas e analisadas com o uso de um citotômetro de Fluxo Intellicyt IQue (Intellicyt). Os dados fluorescentes gerados por ligação de huLAG-3-Fc a células de A375 foram analisados com o uso de software Forecyt, e os meios fluorescentes geométricos resultantes foram normalizados à ligação máxima de huLAG-3-Fc. O percentual de ligação de huLAG-3-Fc foi plotado e enquadrado utilizando software Graphpad. Os valores de  $IC_{50}$  das SEQ ID NOs: 7, 19 a 28 e 85 a 94 são resumidos na **Tabela 4** e as curvas de ligação de competição selecionadas são fornecidas na **Figura 3**. Os dados mostram que todas as mureínas de lipocalina otimizadas competem com a ligação de huLAG-3 ao seu MHC da classe II de ligante em células que expressam MHC da classe II humanas. O limite de detecção para tal experimento foi alcançado e a melhor hora, desse modo, de  $IC_{50}$  de mureínas de lipocalina otimizadas em comparação com mureínas parentais, se houver, não foi observada. A mureína de lipocalina de controle negativo (SEQ ID NO: 3), que não se liga a LAG-3, não mostrou qualquer competição.

[00180] **Tabela 4:** Mureínas de lipocalina competem com a ligação de huLAG-3 ao seu MHC da classe II de ligante em células que expressam MHC da classe II.

SEQ ID NO:	$IC_{50}$ [nM]
7	0,22
85	0,38

86	0,78
87	0,32
88	1,4
89	0,58
90	0,25
91	0,39
92	0,23
93	0,29
94	0,41
19	1,2
20	1,7
21	0,68
22	1,11
23	0,63
24	1,01
25	0,3
26	0,54
27	0,39
28	0,55
5 e 6	0,28

**[00181] Exemplo 7: Avaliação de estabilidade térmica de muteínas de lipocalina**

**[00182]** Para determinar as temperaturas de fusão ( $T_{mS}$ ) das muteínas de lipocalina, que são um indicador geral da estabilidade final, as muteínas específicas de LAG-3, em concentração de proteína de 1 mg/ml em PBS (Gibco), foram varridas (25-100 °C) a 1 °C/min, utilizando um instrumento nanoDSC capilar (CSC 6300, TA Instruments). As  $T_{mS}$  foram calculadas a partir do termograma exibido, utilizando o software Nano Analyze integrado.

**[00183]** As temperaturas de fusão máximas resultantes assim como o início de fusão para muteínas de lipocalina exemplificativas (SEQ ID NOs: 7, 19 a 28, 85 a 94 e 67) são listadas na **Tabela 5** abaixo. Quase todas as muteínas de lipocalina possuem  $T_{mS}$  na faixa de 60 a 80 °C, o que indica boa estabilidade geral com relação a cada uma dessas muteínas.

[00184] **Tabela 5:**  $T_m$  e temperatura de fusão de início conforme determinado por nanoDSC de mutoínas de lipocalina específicas de LAG-3

SEQ ID NO:	$T_m$ [°C]	Fusão de início [°C]
7	73 e 81	58
85	72	60
86	74	60
87	72	61
88	68	55
89	65	54
90	66 e 72	59
91	80	66
92	80	69
93	69 e 73	58
94	67	55
19	58 e 67	42
20	64 e 69	49
21	58 e 69	50
22	64	56
23	55 e 67	47
24	59 e 68	51
25	60 e 68	50
26	59 e 70	50
27	60 e 70	49
28	63 e 70	51
67	88	74

[00185] As modalidades descritas ilustrativamente no presente documento podem ser adequadamente praticadas na ausência de qualquer

elemento ou quaisquer elementos, limitação ou limitações, não especificamente revelados no presente documento. Desta forma, por exemplo, as expressões "que comprehende", "que inclui", "que contém" etc. deverão ser lidas de forma expansiva e sem limitação. Além disso, os termos e expressões empregues no presente documento foram utilizados como termos descritivos e não limitativos e não há intenção, no uso desses termos e expressões, de excluir nenhum equivalente das características exibidas e descritas ou suas partes, mas se reconhece que diversas modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Dever-se-á compreender, portanto, que, embora as presentes modalidades tenham sido especificamente divulgadas por modalidades preferidas e características opcionais, os técnicos na área podem recorrer às suas modificações e variações e essas modificações e variações são consideradas como estando dentro do escopo desta invenção. Todas as patentes, pedidos de patente, livros-texto e publicações analisadas por profissionais da área descritas no presente documento são integralmente incorporadas ao presente como referência. Além disso, quando uma definição ou uso de um termo em uma referência, que é incorporada ao presente documento como referência, for inconsistente ou contrária à definição daquele termo fornecida no presente, aplica-se a definição daquele termo fornecida no presente documento e a definição daquele termo na referência não se aplica. Cada uma das espécies mais estreitas e agrupamentos subgenéricos que se encontram dentro da descrição genérica também faz parte da invenção. Isso inclui a descrição genérica da invenção com ressalva ou limitação negativa que remove qualquer objeto do gênero, independentemente se o material retirado é ou não especificamente indicado no presente documento. Além disso, quando características forem descritas em termos de grupos Markush, os técnicos na área reconhecerão que a descrição também é

descrita, portanto, em termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo Markush. Modalidades adicionais tornar-se-ão evidentes a partir das reivindicações a seguir.

[00186] Equivalentes: Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou poderão reafirmar com o uso de no máximo experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descrita no presente documento. Esses equivalentes destinam-se a ser englobados pelas reivindicações a seguir. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados no presente relatório descritivo são incorporados ao presente documento como referência ao relatório descritivo, da mesma forma como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado como sendo incorporado ao presente documento como referência.

### **Referências de Não Patentes**

1. TRIEBEL, F., JITSKUAWA, S., BAIXERAS, E., ROMAN-ROMAN, S., GENEVEE, C., VIEGAS-PEQUIGNOT, E. & HERCEND, T. 1990. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*, 171, 1.393 a 1.405.
2. KISIELOW, M., KISIELOW, J., CAPOFERRI-SOLLAMI, G. & KARJALAINEN, K. 2005. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur J Immunol*, 35, 2.081 a 2.088.
3. WORKMAN, C. J., WANG, Y., EL KASMI, K. C., PARDOLL, D. M., MURRAY, P. J., DRAKE, C. G. & VIGNALI, D. A. 2009. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol*, 182, 1.885 a 1891.
4. HUARD, B., MASTRANGELI, R., PRIGENT, P., BRUNIQUEL, D., DONINI, S., EL-TAYAR, N., MAIGRET, B., DREANO, M. & TRIEBEL, F. 1997. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S*

A, 94, 5.744 a 5.749.

5. BUISSON, S. & TRIEBEL, F. 2003. MHC class II engagement by its ligand LAG-3 (CD223) leads to a distinct pattern of chemokine and chemokine receptor expression by human dendritic cells. *Vaccine*, 21, 862 a 868.
6. ANDREAE, S., PIRAS, F., BURDIN, N. & TRIEBEL, F. 2002. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*, 168, 3.874 a 3.880.
7. MACON-LEMAITRE, L. & TRIEBEL, F. 2005. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. *Immunology*, 115, 170 a 178.
8. WOO, S. R., TURNIS, M. E., GOLDBERG, M. V., BANKOTI, J., SELBY, M., NIRSCHL, C. J., BETTINI, M. L., GRAVANO, D. M., VOGEL, P., LIU, C. L., TANGSOMBATVISIT, S., GROSSO, J. F., NETTO, G., SMELTZER, M. P., CHAUX, A., UTZ, P. J., WORKMAN, C. J., PARDOLL, D. M., KORMAN, A. J., DRAKE, C. G. & VIGNALI, D. A. 2012. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res*, 72, 917 a 927.
9. ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3.389 a 3.402.
10. SKERRA, A. 2000. Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337 a 350.
11. FLOWER, D. R., NORTH, A. C. & SANSOM, C. E. 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 9 a 24.
12. FLOWER, D. R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 318 ( Pt 1), 1 a 14.

13. FLOWER, D. R. 2000. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 327 a 336.
14. BREUSTEDT, D. A., KORNDORFER, I. P., REDL, B. & SKERRA, A. 2005. The 1.8-A crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J Biol Chem*, 280, 484 a 493.
15. SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
16. PERVAIZ, S. & BREW, K. 1987. Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J*, 1, 209 a 214.
17. SCHMIDT, T. G., KOEPKE, J., FRANK, R. & SKERRA, A. 1996. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, 255, 753 a 766.
18. VAJO, Z. & DUCKWORTH, W. C. 2000. Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millennium. *Pharmacol Rev*, 52, 1 a 9.
19. KONIG, T. & SKERRA, A. 1998. Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J Immunol Methods*, 218, 73 a 83.
20. DENNIS, M. S., ZHANG, M., MENG, Y. G., KADKHO-DAYAN, M., KIRCHHOFER, D., COMBS, D. & DAMICO, L. A. 2002. Albulin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J Biol Chem*, 277, 35.035 a 35.043.
21. OSBORN, B. L., OLSEN, H. S., NARDELLI, B., MURRAY, J. H., ZHOU, J. X., GARCIA, A., MOODY, G., ZARITSKAYA, L. S. & SUNG, C. 2002. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 540 a 548.

22. FUERTGES, F. & ABUCHOWSKI, A. 1990. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *Journal of Controlled Release*, 11, 139 a 148.
23. LOWMAN, H. B. 1997. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26, 401 a 424.
24. RODI, D. J. & MAKOWSKI, L. 1999. Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol*, 10, 87 a 93.
25. VENTURI, M., SEIFERT, C. & HUNTE, C. 2002. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J Mol Biol*, 315, 1 a 8.
26. BRUCKDORFER, T., MARDER, O. & ALBERICIO, F. 2004. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr Pharm Biotechnol*, 5, 29 a 43.
27. KIM, H. J., EICHINGER, A. & SKERRA, A. 2009. High-affinity recognition of lanthanide (III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2. *J Am Chem Soc*, 131, 3565-76.

## REIVINDICAÇÕES

1. Muteína de lipocalina, caracterizada pelo fato de que tem capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por  $K_d$  de cerca de 250 nM ou menos.

2. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a muteína tem capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por  $K_d$  de cerca de 50 nM ou menos.

3. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a muteína tem capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por  $K_d$  de cerca de 3 nM ou menos.

4. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a muteína tem capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por  $K_d$  de cerca de 0,1 nM ou menos.

5. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a muteína tem capacidade para ligar LAG-3 com uma afinidade medida por  $K_d$  de cerca de 0,05 nM ou menos.

6. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que os valores de  $K_d$  são determinados por análise por ressonância de plásmon de superfície conforme essencialmente descrito no Exemplo 4.

7. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a muteína comprehende pelo menos dois ou mais resíduos de aminoácidos com mutação nas posições de sequência 5, 7 a 8, 10, 14, 16, 25 a 34, 44, 46, 52 a 53, 55 a 56, 58, 60 a 61, 63, 65 a 66, 69 a 70, 73, 79 a 80, 84 a 86, 89 a 90, 93, 96 a 98, 101, 105 a 106, 108, 110 a 114, 121, 124, 148 a 150 e 152 a 154 da sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1).

8. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a muteína comprehende

pelo menos um resíduo de aminoácido com mutação nas posições de sequência 14, 25 a 26, 28, 31 a 32, 52, 55, 58, 66, 79, 84, 86, 101, 105 a 106, 108, 110, 112 a 114 e 121 da sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1).

9. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a muteína comprehende, ainda, pelo menos um ou mais resíduos de aminoácidos com mutação nas posições de sequência 5, 7 a 8, 10, 16, 26 a 34, 44, 46, 53, 56, 58, 60 a 61, 63, 65 a 66, 69 a 70, 73, 79 a 80, 85, 89 a 90, 93, 96 a 98, 101, 105 a 106, 108, 110 a 111, 114, 121, 124, 148 a 150, 152 a 154 e 156 a 157 da sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1).

10. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a muteína comprehende, ainda, pelo menos um ou mais resíduos de aminoácidos com mutação nas posições de sequência 5, 7 a 8, 10, 16, 26 a 34, 44, 46, 53, 56, 58, 60 a 61, 63, 65, 69 a 70, 73, 79 a 80, 85, 89 a 90, 93, 96 a 98, 101, 105 a 106, 108, 111, 114, 124, 148 a 150, 152 a 154 e 156 a 157 da sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1).

11. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que a muteína comprehende, ainda, pelo menos um ou mais resíduos de aminoácidos com mutação nas posições de sequência 5, 7 a 8, 10, 16, 44, 46, 63, 65, 69 a 70, 73, 80, 84, 89 a 90, 93, 96 a 98, 113, 124, 148 a 150, 152 e 154 da sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1).

12. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da muteína comprehende dois ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos com

mutação em comparação com a sequência de polipeptídios linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1): Ala 5 → Thr; Asp 7 → Gly; Glu 8 → Gln; Ile 10 → Phe; Ser 14 → Pro; Thr 16 → Met; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser, Asp, Glu, Ala, ou Gly; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys ou Asp; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile ou Leu; Asn 32 → Asp, Met ou Thr; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 44 → His; Gly 46 → Asp; Lys 52 → Arg; Val 53 → Ala; Met 55 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe ou Asp; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Ala 66 → Asn; Glu 69 → Gly; Lys 70 → Arg; Glu 73 → Ala; Ala 79 → Thr ou Glu; Asp 80 → Gly; His 84 → Tyr ou Leu; Val 85 → Ala ou Asp; Ala 86 → Asp; Ile 89 → Ser ou Asn; Arg 90 → Ser; Val 93 → Glu; His 96 → Asn; Tyr 97 → His; Ile 98 → Val; Cys 101 → Ser ou Phe; Leu 105 → Cys ou Gly; His 106 → Ala, Gln, Glu, Lys ou Pro; Lys 108 → Tyr ou Thr; Val 110 → Gly ou Asn; Arg 111 → Pro; Gly 112 → Met, Val, ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu; Lys 114 → Trp ou Ala; Lys 121 → Thr; Leu 124 → Gln; Arg 148 → Trp; Gln 149 → Leu; Ser 150 → Gly; Thr 152 → Pro; Cys 153 → Ser; e Ser 154 → Ala.

13. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da muteína compreende pelo menos um dos seguintes resíduos de aminoácidos com mutação em comparação com a sequência de polipeptídios linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1): Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser, Asp, Glu, Ala ou Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Met ou Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr ou Leu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln, Glu, Lys ou Pro; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly ou Asn; Gly 112 → Met, Val ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr.

14. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da muteína

compreende pelo menos um dos seguintes resíduos de aminoácidos com mutação em comparação com a sequência de polipeptídios linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1): Ala 5 → Thr; Asp 7 → Gly; Glu 8 → Gln; Ile 10 → Phe; Thr 16 → Met; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 44 → His; Gly 46 → Asp; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Lys 70 → Arg; Glu 73 → Ala; Ala 79 → Thr; Asp 80 → Gly; Val 85 → Ala ou Asp; Ile 89 → Ser ou Asn; Arg 90 → Ser; Val 93 → Glu; His 96 → Asn; Tyr 97 → His; Ile 98 → Val; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Leu 124 → Gln; Arg 148 → Trp; Gln 149 → Leu; Ser 150 → Gly; Thr 152 → Pro; Cys 153 → Ser; e Ser 154 → Ala.

15. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pelo fato de que a muteína de lipocalina se liga a LAG-3 com um valor de EC<sub>50</sub> de cerca de 320 nM ou menos.

16. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que a muteína de lipocalina se liga a LAG-3 com um valor de EC<sub>50</sub> de cerca de 10 nM ou menos.

17. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que a muteína de lipocalina se liga a LAG-3 com um valor de EC<sub>50</sub> de cerca de 0,2 nM ou menos.

18. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, caracterizada pelo fato de que os ditos valores de EC<sub>50</sub> são medidos por separação de células ativadas por fluorescência, conforme essencialmente descrito no Exemplo 5.

19. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizada pelo fato de que a muteína sofre

reação cruzada tanto com LAG-3 humano quanto LAG-3 cinomolgo.

20. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizada pelo fato de que a muteína tem capacidade para interferir na ligação de LAG-3 humano a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II.

21. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a capacidade para interferir na ligação de LAG-3 humano complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II é analisada por separação de células ativadas por fluorescência, conforme essencialmente descrito no Exemplo 6.

22. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da muteína compreende as seguintes mutações de aminoácido: Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; e uma ou mais dentre as seguintes mutações de aminoácido: Ala 5 → Thr; Asp 7 → Gly; Glu 8 → Gln; Ile 10 → Phe; Thr 16 → Met; Leu 44 → His; Gly 46 → Asp; Val 53 → Ala; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Lys 70 → Arg; Glu 73 → Ala; Ala 79 → Thr; Asp 80 → Gly; Val 85 → Ala ou Asp; Ile 89 → Ser ou Asn; Arg 90 → Ser; Val 93 → Glu; His 96 → Asn; Tyr 97 → His; Ile 98 → Val; Leu 124 → Gln; Arg 148 → Trp; Gln 149 → Leu; Ser 150 → Gly; Thr 152 → Pro; e Ser 154 → Ala.

23. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da muteína compreende as seguintes mutações de aminoácido: Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Phe 28 → Asp; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp;

Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; e uma ou mais dentre as seguintes mutações de aminoácido: Arg 26 → Ser, Asp, Glu, Gly, ou Ala; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; Leu 56 → Asp; His 84 → Tyr ou Leu; His 106 → Gln, Glu, Lys, ou Pro; Val 110 → Gly ou Asn; Gly 112 → Met, Val ou Leu; Val 113 → Ala ou Leu.

24. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da muteína compreende um dos seguintes conjuntos de mutações de aminoácido:

(a) Ala 5 → Thr; Glu 8 → Gln; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; e Ser 154 → Ala;

(b) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Gly; e Cys 153 → Ser;

(c) Asp 7 → Gly; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Arg 148 → Trp; Thr 152 → Pro; e Cys 153 → Ser;

(d) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60

→ Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Ala 79 → Thr; Tyr 97 → His; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(e) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Val 85 → Asp; Arg 90 → Ser; His 96 → Asn; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Leu 124 → Gln; e Cys 153 → Ser;

(f) Thr 16 → Met; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 44 → His; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Ile 89 → Ser; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(g) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Gln 149 → Leu; e Cys 153 → Ser;

(h) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Lys 70 → Arg; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(i) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Asp 80 → Gly; Ile 89 → Asn; Ile 98 → Val; Cys

101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(j) Ile 10 → Phe; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Glu 73 → Ala; Ile 89 → Asn; Val 93 → Glu; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(k) Ala 5 → Thr; Glu 8 → Gln; Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; e Ser 154 → Ala;

(l) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(m) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(n) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(o) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 →

Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Glu; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Val; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(p) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Leu; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(q) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(r) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ala; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Lys; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(s) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Asn; Gly 112 → Met; Val 113 → Ala; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(t) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Tyr; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Pro; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(u) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 →

Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; His 84 → Leu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Val 113 → Leu; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr;

(v) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Met; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; e Lys 121 → Thr; ou

(w) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Gln 149 → Leu.

25. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da muteína compreende um dos seguintes conjuntos de mutações de aminoácido:

(a) Ala 5 → Thr; Glu 8 → Gln; Lys 65 → Glu; Glu 69 → Gly; Val 85 → Ala; e Ser 154 → Ala;

(b) Ala 5 → Thr; Gly 46 → Asp; Lys 65 → Glu; Val 85 → Ala; e Ser 150 → Gly;

(c) Asp 7 → Gly; Val 85 → Asp; Arg 148 → Trp; e Thr 152 → Pro;

(d) Ala 5 → Thr; Val 53 → Ala; Lys 65 → Glu; Ala 79 → Thr; e Tyr 97 → His;

(e) Glu 63 → Asp; Val 85 → Asp; Arg 90 → Ser; His 96 → Asn; e Leu 124 → Gln;

(f) Thr 16 → Met; Leu 44 → His; Lys 65 → Glu; e Ile 89 → Ser;

- (g) Glu 63 → Asp; Lys 65 → Glu; e Gln 149 → Leu; e
- (h) Lys 65 → Glu e Lys 70 → Arg;
- (i) Ala 5 → Thr; Lys 65 → Glu; Asp 80 → Gly; Ile 89 → Asn; e Ile 98 → Val;
- (j) Ile 10 → Phe; Lys 65 → Glu; Glu 73 → Ala; Ile 89 → Asn; e Val 93 → Glu;
- (k) Arg 26 → Asp; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Met;
- (l) Arg 26 → Glu; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Met;
- (m) Arg 26 → Glu; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Glu; e Gly 112 → Val;
- (n) Arg 26 → Asp; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Leu;
- (o) Arg 26 → Ser; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Met;
- (p) Arg 26 → Ala; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Lys; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Met;
- (q) Asn 32 → Thr; His 106 → Gln; Val 110 → Asn; Gly 112 → Met; e Val 113 → Ala;
- (r) Arg 26 → Gly; Met 31 → Leu; Asn 32 → Thr; His 84 → Tyr; His 106 → Pro; Val 110 → Gly; e Gly 112 → Met; ou
- (s) Arg 26 → Asp; Asn 32 → Thr; His 84 → Leu; His 106 → Gln; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; e Val 113 → Leu.

26. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da muteína compreende resíduos de cisteína nas posições de sequência 61 e 153 da sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1).

27. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 25, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da muteína compreende, ainda, um ou dois dos seguintes resíduos de aminoácidos com mutação em comparação com sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1): Ala 5 → Thr e Asp 12 → Asn.

28. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da muteína compreende, ainda, pelo menos um dos seguintes resíduos de aminoácidos com mutação em comparação com sequência de polipeptídeos linear de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1): Asp 7 → Asn, Arg, ou Lys; Glu 9 → Gln, Arg, ou Lys; Asp 12 → Asn ou Arg; Glu 45 → Arg; Asp 72 → Asn, Arg, ou Lys; Glu 73 → Arg; Asp 80 → Gly; e Asp 95 → Asn, Arg, ou Lys.

29. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizada pelo fato de que a muteína compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 8 a 18, 20 a 28, 57 a 70 e 85 a 95 ou de um fragmento ou variante das mesmas.

30. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizada pelo fato de que a muteína tem pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97,5% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste nas SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 8 a 18, 20 a 28, 57 a 70 e 85 a 95.

31. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizada pelo fato de que a muteína é conjugada a um composto selecionado dentre o grupo que consiste em uma molécula orgânica, uma marcação de enzima, uma marcação radioativa, uma marcação colorida, uma marcação fluorescente, uma marcação cromogênica, uma marcação luminescente, um hapteno, digoxigenina,

biotina, um agente citostático, uma toxina, um complexo metálico, um metal e ouro coloidal.

32. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, caracterizada pelo fato de que a muteína é fundida em sua terminação N e/ou sua terminação C a um parceiro de fusão que é uma proteína, um domínio de proteína ou um peptídeo.

33. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizada pelo fato de que a muteína é fundida em sua terminação N e/ou sua terminação C a um parceiro de fusão que é um anticorpo ou um fragmento de anticorpo.

34. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, caracterizada pelo fato de que a muteína é conjugada a um composto que estende a meia-vida sérica da muteína.

35. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que o composto que estende a meia-vida sérica é selecionado dentre o grupo que consiste em uma molécula de polialquileno glicol, hidroetilamido, uma parte Fc de uma imunoglobulina, um domínio C<sub>H</sub>3 de uma imunoglobulina, um domínio C<sub>H</sub>4 de uma imunoglobulina, um peptídeo de ligação a albumina e uma proteína de ligação a albumina.

36. Muteína de lipocalina, de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato de que a molécula de polialquileno glicol é polietileno (PEG) ou um derivado ativado do mesmo.

37. Molécula de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma muteína de lipocalina, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36.

38. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico, como definida na reivindicação 37.

39. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que contém uma molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 38.

40. Método para produzir uma muteína de lipocalina, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizado pelo fato de que a muteína é produzida a partir do ácido nucleico que codifica a muteína ou fragmento da mesma por meio de métodos de engenharia genética.

41. Método para ligar LAG-3 em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende aplicar uma ou mais muteínas de lipocalina, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, ou uma ou mais composições que compreendem tais muteínas.

42. Método para estimular a resposta imunológica em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende aplicar uma ou mais muteínas de lipocalina, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, ou uma ou mais composições que compreendem tais muteínas.

43. Método para induzir proliferação de linfócitos T em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende aplicar uma ou mais muteínas de lipocalina, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, ou uma ou mais composições que compreendem tais muteínas.

44. Método para interferir na ligação de LAG-3 humana a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende aplicar uma ou mais muteínas de lipocalina, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, ou uma ou mais composições que compreendem tais muteínas.

45. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizada pelo fato de que a muteína compete com a ligação de LAG-3 humana a células que expressam complexo de

histocompatibilidade principal (MHC) classe II.

46. Muteína de lipocalina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizada pelo fato de que a muteína compete com a ligação de LAG-3 humano a células que expressam complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II, quando medida em um ensaio de separação de células ativadas por fluorescência, conforme essencialmente descrito no Exemplo 6.

47. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma muteína de lipocalina, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

48. Imunoconjunto ou proteína de fusão, caracterizado pelo fato de que compreende as muteínas de lipocalina, ou fragmento das mesmas, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, ligadas a um agente terapêutico.

49. Uso de uma muteína, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, para a ligação/detecção de LAG-3, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) colocar a muteína em contato com uma amostra de teste suspeita de conter LAG-3, permitindo, assim, a formação de um complexo entre a muteína e LAG-3; e

(b) detectar o complexo entre a muteína e LAG-3 por um sinal adequado.

50. Kit diagnóstico ou analítico, caracterizado pelo fato de que compreende uma muteína, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36.

51. Método para detectar a presença de LAG-3 em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que o método compreende colocar a amostra em contato com uma muteína, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, sob condições que permitem a

formação de um complexo de mutoína e LAG-3.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que compreende, ainda, detectar o complexo da mutoína e LAG-3.

53. Método, de acordo com a reivindicação 51 ou 52, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é isolada de um ser humano.

54. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 53, caracterizado pelo fato de que a amostra compreende fluido corporal.

Figura 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
SEQ ID NO: 1 (lipocalina de lágrima humana)	H	H	L	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D	
SEQ ID NO: 3 (muteína de lipocalina de controle negativo)	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 4 (muteína de lipocalina de controle negativo)	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 7	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 8	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 9	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 10	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 11	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 12	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 13	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 14	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 15	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 16	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 17	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 18	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 19	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 20	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 21	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 22	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 23	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 24	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 25	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 26	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 27	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 28	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 57	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 58	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 59	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 60	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 61	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 62	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 63	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 64	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 65	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 66	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 67	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 68	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 69	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				
SEQ ID NO: 70	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	A	M	T	V	D				

Figura 1 (continuação)

	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
SEQ ID NO: 1	R	E	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	L	E	G	G	N	L	E	A	K	V	T	M
SEQ ID NO: 3	R	E	R	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	L	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 4	R	E	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	L	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 7	S	E	R	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	L	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 8	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 9	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 10	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 11	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 12	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 13	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 14	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 15	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 16	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 17	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 18	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 19	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 20	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 21	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 22	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 23	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 24	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 25	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 26	R	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 27	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 28	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 57	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 58	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 59	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 60	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 61	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 62	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 63	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 64	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 65	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 66	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 67	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 68	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 69	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M
SEQ ID NO: 70	S	E	R	F	P	E	M	N	L	E	S	S	V	T	P	M	T	L	T	E	G	G	G	N	N	E	E	V	T	M

Figura 1 (continuação)

	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
SEQ ID NO: 1	L	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 3	L	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 4	L	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 7	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 8	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 9	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 10	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 11	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 12	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 13	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 14	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 15	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 16	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 17	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 18	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 19	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 20	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 21	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 22	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 23	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 24	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 25	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 26	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 27	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 28	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 57	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 58	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 59	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 60	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 61	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 62	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 63	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 64	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 65	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 66	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 67	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 68	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 69	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		
SEQ ID NO: 70	S	F	S	G	R	C	G	E	V	K	A	V	L	E	K	T	T	K	G	K	Y	T	A	D	G	K	H	V		

Figura 1 (continuação)

	85	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115
SEQ ID NO: 1	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	C	H	Y	I	S	Y	C	E	G	L	R	G	V	K	L	L	L	L			
SEQ ID NO: 3	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	R	R	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 4	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 7	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 8	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 9	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 10	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 11	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 12	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 13	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 14	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 15	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 16	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 17	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 18	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 19	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 20	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 21	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 22	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 23	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 24	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 25	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 26	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 27	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 28	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 57	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 58	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 59	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 60	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 61	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 62	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 63	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 64	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 65	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 66	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 67	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 68	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 69	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			
SEQ ID NO: 70	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	S	Y	Y	E	G	G	G	G	V	V	W	L	L	L			

Figura 1 (continuação)

Figura 2

Figura 2A

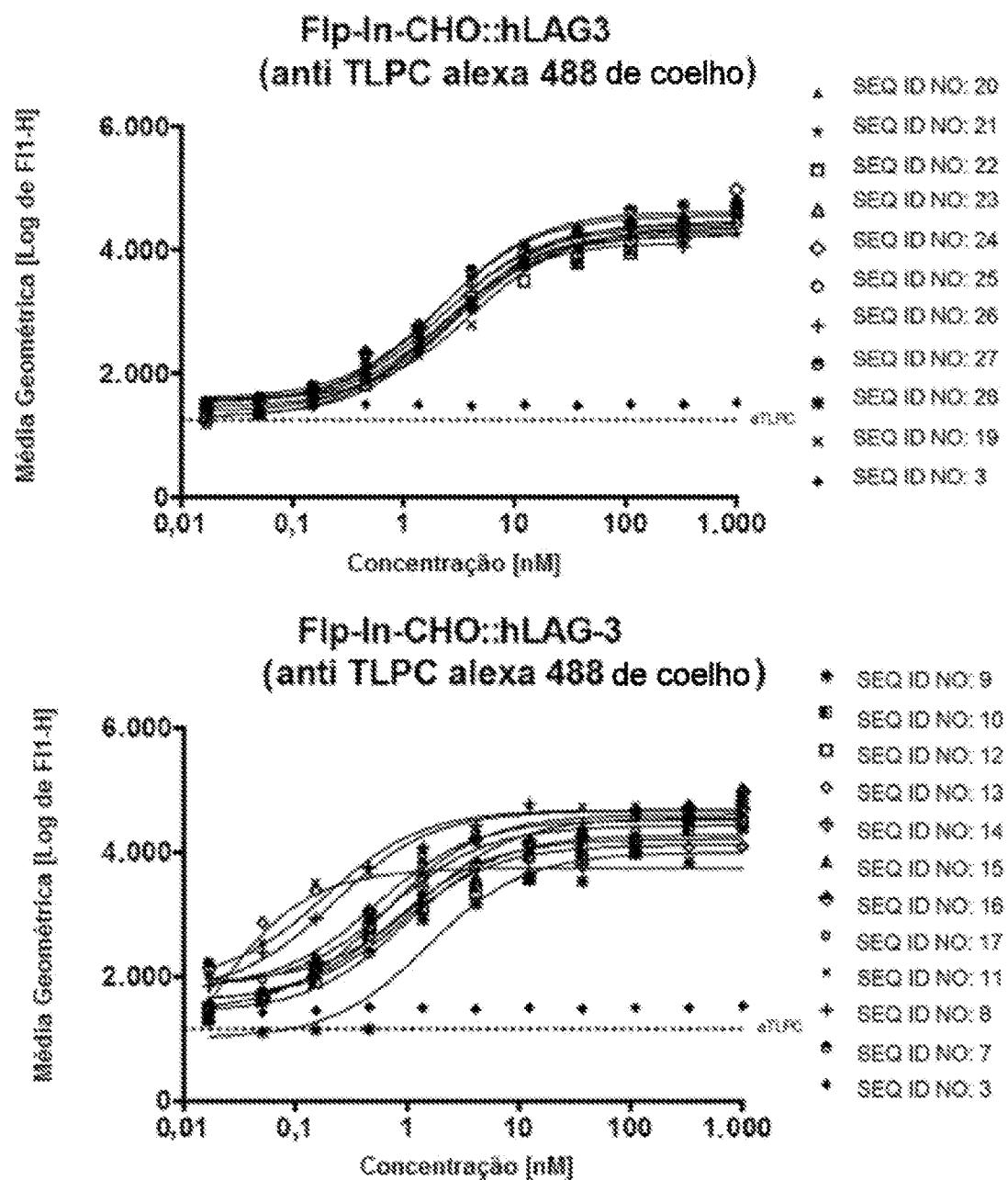
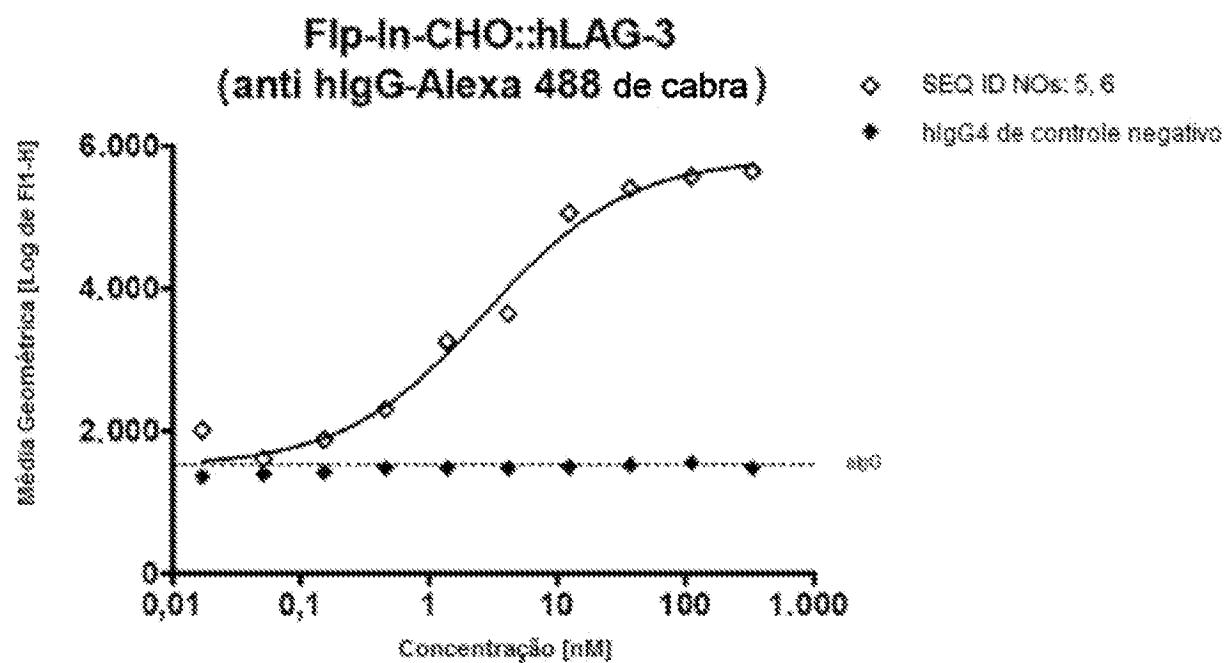
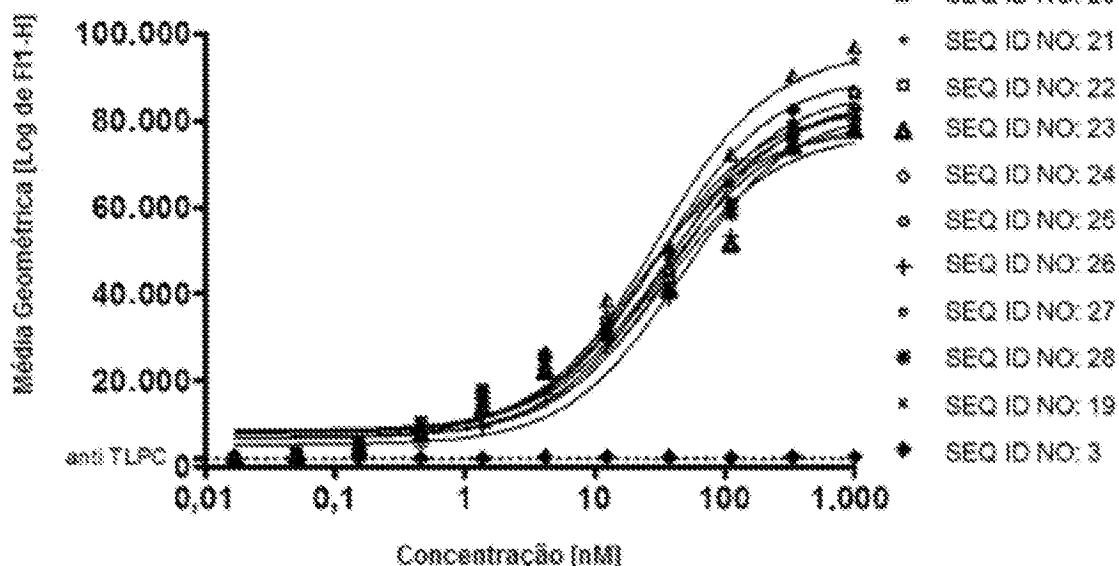


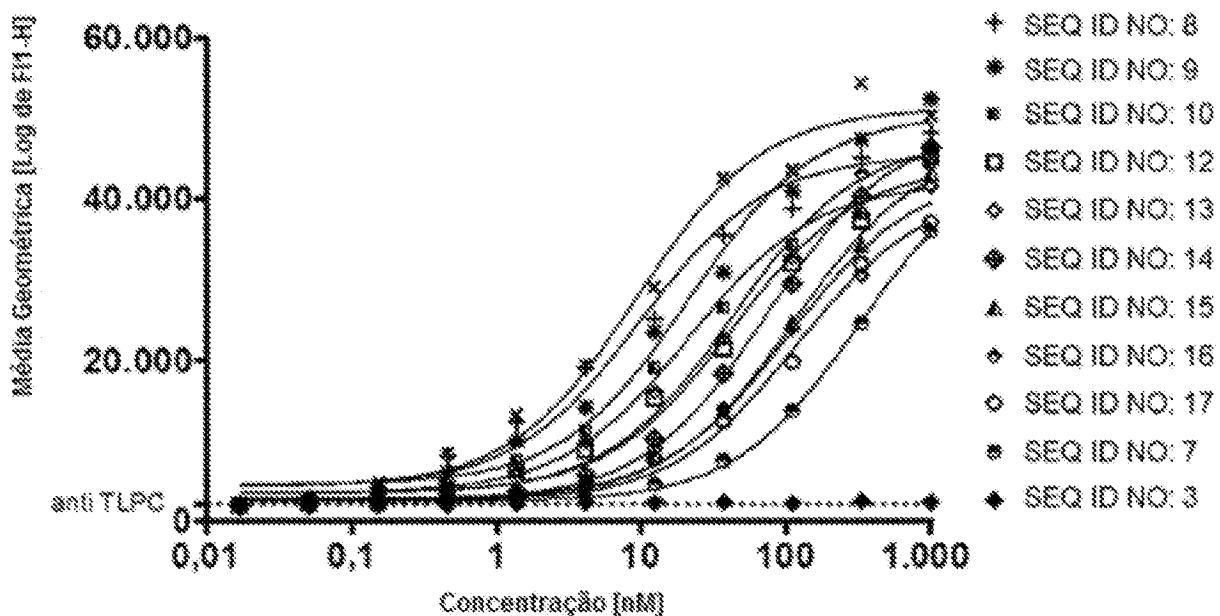
Figura 2A (continuação)

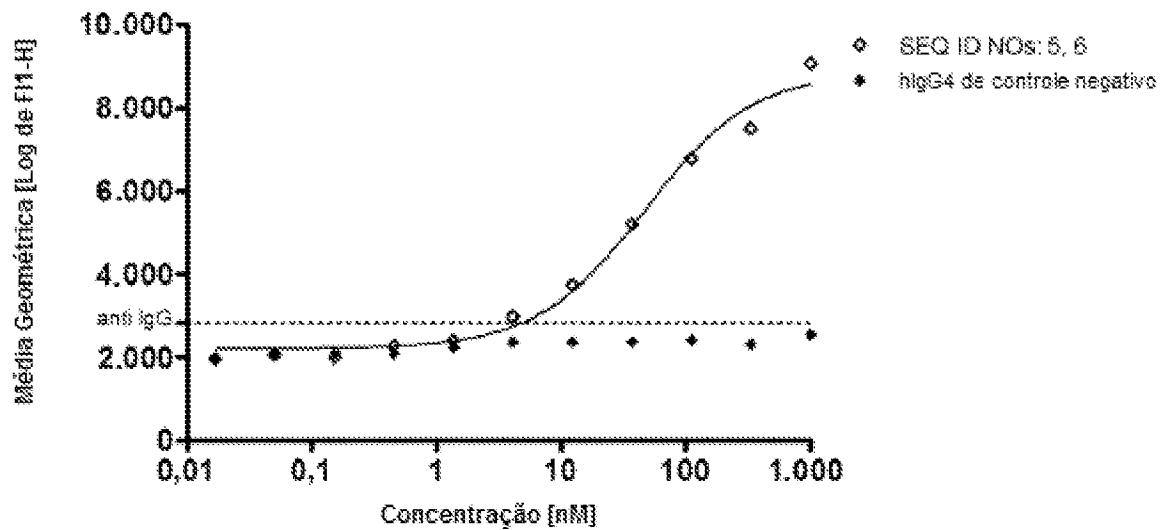


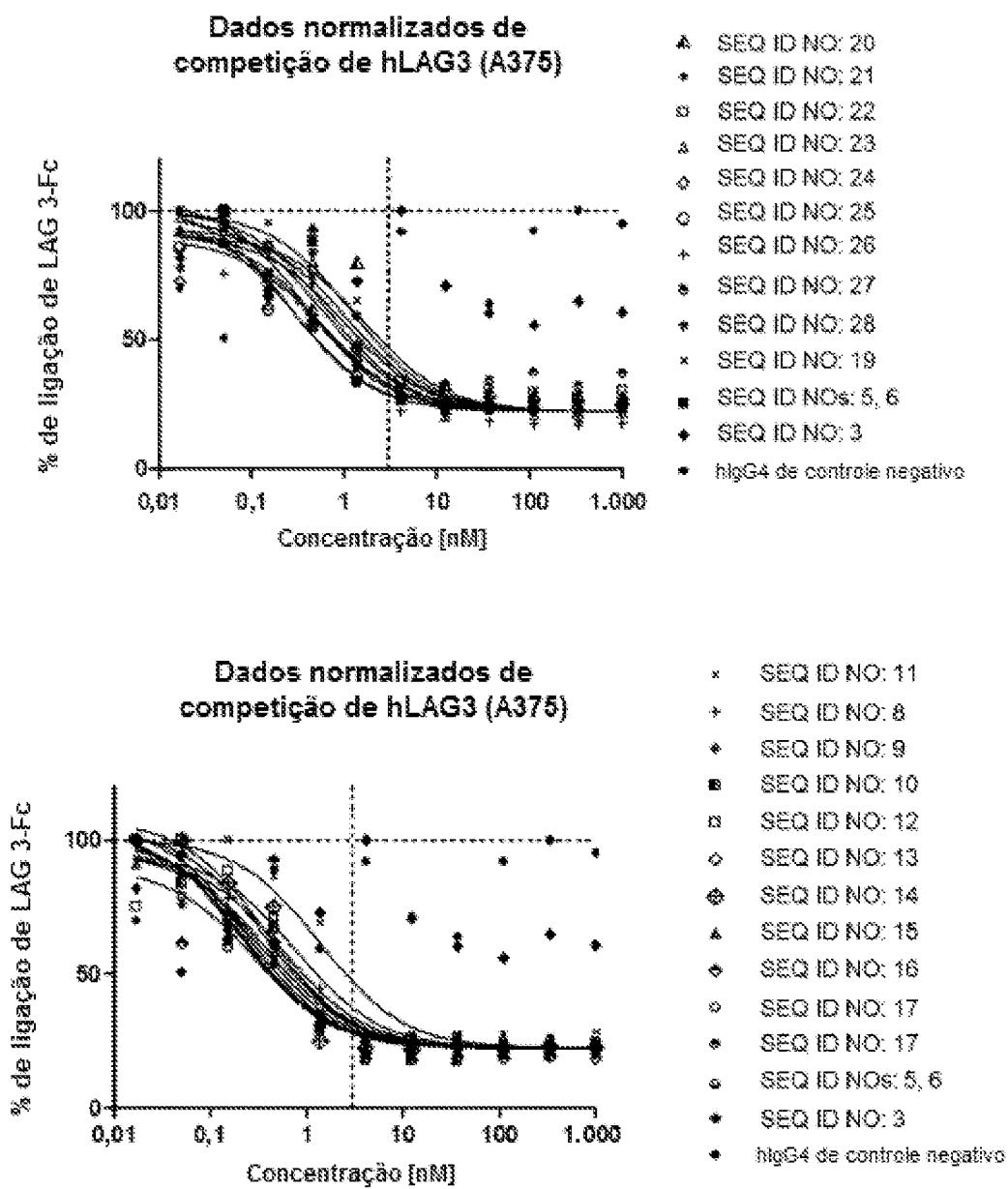
**Figura 2B**  
**Flp-In-CHO::hLAG3**  
**(anti TLPC alexa 488 de coelho)**



**Flp-In-CHO::hLAG3**  
**(anti TLPC alexa 488 de coelho)**



**Figura 2B (continuação)****Flp-In-CHO::cynoLAG-3  
(anti hIgG-Alexa 488 de cabra)**

**Figura 3**

## RESUMO

### Patente de Invenção: “**MUTEÍNAS DE LIPOCALINA COM AFINIDADE DE LIGAÇÃO PARA LAG-3**”.

A presente invenção refere-se a muteínas de lipocalina lacrimal humana que se ligam especificamente a LAG-3, que pode ser usado em aplicações farmacêuticas, por exemplo, como agentes anticâncer e/ou moduladores imunes para o tratamento ou prevenção de doenças humanas, tal como câncer, doenças infecciosas e doenças autoimunes. A presente descrição mostra, ainda, as muteínas de lipocalina humanas podem inibir a ligação de LAG-3 a MHC classe II em células que superexpressam MHC classe II. A presente descrição também se refere a métodos para produzir muteínas de lipocalina de ligação a LAG-3 descritas no presente documento assim como composições que compreendem tais muteínas de lipocalina. A presente descrição refere-se, ainda, a moléculas de ácido nucleico que codificam tais muteínas de lipocalina e a métodos para geração de tais muteínas de lipocalina e moléculas de ácido nucleico. Adicionalmente, o pedido descreve usos terapêuticos e/ou diagnósticos dessas muteínas de lipocalina assim como composições que compreendem uma ou mais de tais muteínas de lipocalina.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

**Código de Controle**

Campo 1



Campo 2



**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA DE TRADUÇÃO 30 OU 60
- Data de Geração do Código: 04/09/2019
- Hora de Geração do Código: 18:12:41
- Código de Controle:
  - Campo 1: AD71C5DF301A985E
  - Campo 2: 8619547E99B4686B