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

(21) BR 112021006783-3 A2

(22) Data do Depósito: 11/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 13/07/2021

(54) Título: PROTEÍNA DE FUSÃO FC HETERODIMÉRICA DE IL-15/R¿ DIRECIONADA, COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, COMPOSIÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO FC HETERODIMÉRICA DE IL-15/R¿ DIRECIONADA E DE TRATAMENTO DE UM CÂNCER.

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; C07K 14/54; C07K 14/715; A61P 35/00; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 12/10/2018 US 62/744,946; 21/12/2018 US 62/784,334.

(71) Depositante(es): XENCOR, INC..

(72) Inventor(es): MATTHEW BERNETT; JOHN R. DESJARLAIS; MICHAEL HEDVAT; SUZANNE SCHUBBERT; CHRISTINE BONZON; RUMANA RASHID.

(86) Pedido PCT: PCT US2019055956 de 11/10/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/077276 de 16/04/2020

(85) Data da Fase Nacional: 08/04/2021

(57) Resumo: PROTEÍNA DE FUSÃO FC HETERODIMÉRICA DE IL-15/R? DIRECIONADA, COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, COMPOSIÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO FC HETERODIMÉRICA DE IL-15/R? DIRECIONADA E DE TRATAMENTO DE UM CÂNCER. A presente invenção se refere a proteínas de fusão Fc heterodiméricas direcionadas a PD-1 inovadoras que compreendem uma proteína de fusão Fc IL-15/IL-15Ra e uma proteína de fusão Fc de fragmento de anticorpo PD-1. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão IL-15/Ra-Fc direcionadas a PD-1 são administradas a um paciente para tratar o câncer. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão IL-15/Ra-Fc direcionadas a PD-1 são administradas em combinação com um anticorpo de bloqueio PD-1, como nivolumabe e/ou pembrolizumabe. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão IL-15/Ra-Fc direcionadas a PD-1 não competem com um anticorpo de bloqueio PD-1, como nivolumabe e/ou pembrolizumabe pela ligação ao antígeno.

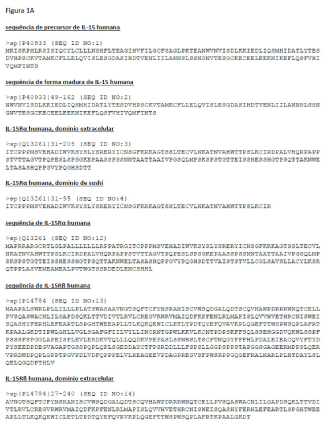


Figura 1A

sequência de precursor de IL-15 humana

>sp|P40933 (SEQ ID NO:1)
MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES
DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHI
VQMFINTS

sequência de forma madura de IL-15 humana

>sp|P40933|49-162 (SEQ ID NO:2)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN
GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

IL-15Rα humana, domínio extracelular

>sp|Q13261|31-205 (SEQ ID NO:3)
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPP
STVTAVPTPQPESPGSPSAKEPAASFSSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWE
LTASASHQPPGVYPQGHSDTT

IL-15Rα humana, domínio de sushi

>sp|Q13261|31-95 (SEQ ID NO:4)
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

sequência de IL-15Rα humana

>sp|Q13261 (SEQ ID NO:12)
MAPRARGCRTLGLPALLLLLLLRPATDGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLN
KATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASFSSNNTAATTAAIVPGSQLMP
SKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLNSR
QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL

sequência de IL-15Rβ humana

>sp|P14784 (SEQ ID NO:13)
MAAPALSWRLHTVTLVLLSLATPWAAAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELL
PVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWWVALSGFPEPEFLNLVAPIESLGVTWVTETNRCHLRWEI
SQASHYFESHLEFEARTLSPGHTWEEAPLVTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRT
KPAALGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPF
PSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLPQDKEVEEQFSLHEPHVLEGPEARSRHSVQSDNASDSEYSEMRLPSSF
DFDSLPEVDSWTVSSVDLVVTFEGKGEGAVCTFPSRDDLLSFSSPLLGGPSPPSTAPGSSGAGEERMPPSLQER
VPRDWDPQNLGPPTSPQVTPQLTQFLPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSL
QELQGQDPTHLV

IL-15Rβ humana, domínio extracelular

>sp|P14784|27-240 (SEQ ID NO:14)
AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI
VTLRVLCREGVRWWVALSGFPEPEFLNLVAPIESLGVTWVTETNRCHLRWEISQASHYFESHLEFEARTLSPGHTWEE
APLLVTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDT

PROTEÍNA DE FUSÃO FC HETERODIMÉRICA DE IL-15/RA DIRECIONADA, COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, COMPOSIÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO FC HETERODIMÉRICA DE IL-15/RA DIRECIONADA E DE TRATAMENTO DE UM CÂNCER

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

[001] Este pedido reivindica a prioridade do Pedido de Patente Provisório nº US 62/744.946, depositado em 12 de outubro de 2018, e do Pedido de Patente Provisório nº US 62/784.334, depositado em 21 de dezembro de 2018.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Duas abordagens muito promissoras em imunoterapia contra o câncer incluem tratamentos baseados em citocinas e bloqueio de proteínas de ponto de verificação imunológico, como PD-1.

[003] Citocinas como IL-2 e IL-15 funcionam no auxílio à proliferação e diferenciação de células B, células T e células NK. Ambas as citocinas exercem a sua função de sinalização celular através da ligação a um complexo trimérico que consiste em dois receptores compartilhados, a cadeia gama comum (γc; CD132) e a cadeia B do receptor IL-2 (IL-2Rβ; CD122), assim como uma cadeia alfa de receptor exclusivo para cada citocina: receptor alfa de IL-2 (IL-2Rα; CD25) ou receptor alfa de IL-15 (IL-15Rα; CD215). Ambas as citocinas são consideradas terapêuticas potencialmente valiosas em oncologia, e a IL-2 foi aprovada para uso em pacientes com carcinoma de células renais metastático e melanoma maligno. Atualmente, não há usos aprovados de IL-15 recombinante, embora vários ensaios clínicos estejam em andamento. Como fármacos potenciais, ambas as citocinas sofrem de uma depuração muito rápida, com meias-vidas medidas em minutos. A imunoterapia com IL-2 foi associada à toxicidade sistêmica quando administrada em altas doses para superar a eliminação rápida. Essa toxicidade

sistêmica também foi relatada com imunoterapia com IL-15 em ensaios clínicos recentes (Guo et al., J Immunol, 2015, 195 (5): 2.353 a 2.364).

[004] Proteínas de ponto de verificação imunológico, como PD-1, são reguladas de modo crescente após a ativação de células T para impedir a autoimunidade exaurindo-se as células T ativadas após a ligação a ligantes de ponto de verificação imunológico, como PD-L1. No entanto, as proteínas do ponto de verificação imunológico também são reguladas de modo crescente em linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e os ligantes de ponto de verificação imunológico são superexpressos nas células tumorais, contribuindo para o escape imunológico pelas células tumorais. A desrepressão dos TILs pelo bloqueio das interações do ponto de verificação imunológico por medicamentos como Opdivo® (nivolumabe) e Keytruda® (pembrolizumabe) provou ser altamente eficaz no tratamento do câncer. Apesar da promessa de terapias de bloqueio de ponto de verificação como nivolumabe e pembrolizumabe, muitos pacientes ainda não conseguem obter resposta suficiente para o bloqueio de ponto de verificação sozinho.

[005] Portanto, permanece uma necessidade não atendida no tratamento oncológico para estratégias terapêuticas com citocinas que não requerem altas doses e são direcionadas a tumores para evitar toxicidade sistêmica. Além disso, há uma necessidade de identificar modalidades terapêuticas adicionais para empilhar o bloqueio de ponto de verificação que poderia aumentar a taxa de resposta do paciente. Isso pode ser especialmente complexo, pois a modalidade terapêutica adicional não deve competir com o bloqueio do ponto de verificação. A presente invenção aborda essas necessidades e advertências ao fornecer proteínas de fusão de IL-15 direcionadas a PD-1 com meia-vida melhorada e direcionamento mais seletivo de TILs para melhorar o perfil de segurança, e que não competem com os anticorpos de bloqueio de ponto de verificação com os quais podem ser combinadas.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A invenção é direcionada a proteínas de fusão que incluem a combinação de complexos de IL-15 que compreendem, em geral, um domínio IL-15, um domínio IL-15Rα e um domínio de ligação ao antígeno anti-PD-1 (ABD) que não compete pela ligação com nivolumabe ou pembrolizumabe.

[007] Consequentemente, em alguns aspectos, a presente invenção fornece proteínas de fusão Fc heterodiméricas de IL-15/Rα direcionadas que compreendem: a) um primeiro monômero que compreende, do terminal N ao C: i) uma proteína de domínio de IL-15 Rα sushi; ii) um primeiro ligante de domínio; iii) Uma proteína IL-15; e iv) um primeiro domínio Fc variante; e b) um segundo monômero que compreende uma cadeia pesada que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um segundo domínio Fc variante; c) um terceiro monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL; em que os ditos domínios VH e VL formam um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao PD-1 humano e não compete pelo PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

[008] Em aspectos adicionais, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas de IL-15/Rα direcionadas têm um domínio VH que é uma variante de SEQ ID NO: 5 que compreende a substituição de aminoácido F32L e o domínio VL é uma variante de SEQ ID NO: 6 que compreende N27dH, e opcionalmente que compreende ainda as substituições de aminoácidos K30Y/S93T.

[009] Em outros aspectos, a proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada tem o H1 VH e o L1.1 VL.

[0010] Em aspectos adicionais, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas de IL-15/Rα direcionadas têm uma proteína IL-15 variante que compreende substituições de aminoácidos selecionadas do grupo de D30N/E64Q/N65D; D30N/N65D; N1D; N4D; D8N; D30N; D61N; E64Q; N65D; Q108E; N1D/N4D/D8N; N1D/N4D/N65D; N1D/D30N; N1D/D61N;

N1D/D61N/E64Q/Q108E; N1D/E64Q; N1D/N65D; N1D/Q108E; N4D; N4D/D30N; N4D/D61N; N4D/D61N/N65D; N4D/D61N/E64Q/Q108E; N4D/E64Q; N4D/N65D; D8N/D61N; D8N/E64Q; D30N/E64Q; D30N/Q180E; D61N/E64Q/N65D; E64Q; E64Q/N65D; E64Q/Q108E; e N65D/Q108E (em comparação com SEQ ID NO: 2).

[0011] Em outros aspectos, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas IL-15/Rα direcionadas têm um primeiro domínio Fc variante e um segundo domínio Fc variante que compreendem substituições de aminoácidos L368D/K370S: LS364K/E357Q de acordo com a numeração EU.

[0012] Em aspectos adicionais, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas de IL-15/Rα direcionadas da invenção têm um primeiro domínio Fc variante e um segundo domínio Fc variante que compreendem, cada um, substituições de aminoácidos M428L/N343S de acordo com a numeração EU.

[0013] Em outros aspectos, a proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada compreende: a) um primeiro monômero que compreende, do terminal N ao C: i) uma proteína de domínio de IL-15 Rα sushi; ii) um primeiro ligante de domínio; iii) uma proteína IL-15 variante; iv) um segundo ligante de domínio; e v) um primeiro domínio Fc variante que compreende CH2-CH3; e b) um segundo monômero que compreende do terminal N ao C: i) um domínio scFv; ii) um terceiro ligante de domínio; iii) um segundo domínio Fc variante que compreende CH2-CH3; em que o dito domínio scFv compreende um primeiro domínio variável pesado, um ligante scFv e um primeiro domínio variável leve, em que o dito domínio scFv se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

[0014] Em aspectos adicionais, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas de IL-15/Rα direcionadas compreendem: a) um primeiro monômero que compreende, do terminal N ao C: i) uma proteína de domínio

de IL-15 Rα sushi; ii) um primeiro ligante de domínio; iii) um primeiro domínio Fc variante que compreende CH2-CH3; b) um segundo monômero que compreende, do terminal N ao C: i) um domínio scFv; ii) um terceiro ligante de domínio; iii) um segundo domínio Fc variante que compreende CH2-CH3; em que o dito domínio scFv compreende um primeiro domínio variável pesado, um ligante scFv e um primeiro domínio variável leve, e o dito domínio scFv liga PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe; e c) um terceiro monômero que compreende uma proteína de domínio de IL-15 variante.

[0015] Em outros aspectos, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas de IL-15/Rα direcionadas compreendem: a) um primeiro monômero que compreende uma cadeia pesada que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um primeiro domínio Fc variante; b) um segundo monômero que compreende, do terminal N ao C: i) uma proteína de domínio de IL-15 Rα sushi; ii) um segundo ligante de domínio; iii) um segundo domínio Fc variante que compreende CH2-CH3; b) um terceiro monômero que compreende uma proteína de domínio de IL-15 variante; c) um quarto monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL; em que os ditos domínios VH e VL formam um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

[0016] Em aspectos adicionais, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas de IL-15/Rα direcionadas compreendem: a) um primeiro monômero que compreende uma cadeia pesada que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um primeiro domínio Fc variante; b) um segundo monômero que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3-ligante de domínio-proteína de domínio sushi de IL-15Rα-ligante de domínio-proteína de domínio de IL-15 variante, em que o dito CH2-CH3 é um segundo domínio Fc variante; c) um terceiro monômero que compreende

uma cadeia leve que compreende VL-CL; em que os ditos domínios VH e VL formam um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

[0017] Em outros aspectos, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas de IL-15/Rα direcionadas compreendem: a) um primeiro monômero que compreende uma cadeia pesada que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um primeiro domínio Fc variante; b) um segundo monômero que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3-ligante de domínio-proteína de domínio sushi de IL-15Rα de domínio-proteína, em que o dito CH2-CH3 é um segundo domínio Fc variante; c) um terceiro monômero que compreende uma proteína de domínio de IL-15 variante; d) um quarto monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL; em que os ditos domínios VH e VL se ligam ao PD-1 humano e não competem pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

[0018] Em aspectos adicionais, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas de IL-15/Rα direcionadas compreendem: a) um primeiro monômero que compreende, do terminal N ao C: um VH-CH1-ligante de domínio de proteína de IL-15 de ligante de domínio-proteína de domínio-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é uma primeira variante do domínio Fc; b) um segundo monômero que compreende, do terminal N ao C: um VH-CH1-ligante de domínio-proteína de domínio sushi de IL-15Rα-ligante-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um segundo domínio Fc variante; c) um terceiro monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL; em que os ditos domínios VH e VL formam um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

[0019] Em outros aspectos, a proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada que compreende: a) um primeiro monômero que compreende, do terminal N ao C: um VH-CH1-variante ligante de domínio-

proteína de domínio sushi de IL-15Rα-ligante de domínio-proteína de domínio de IL-15 variante-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é uma primeira variante de domínio Fc; b) um segundo monômero que compreende uma cadeia pesada que compreende VH-CH1-dobradiça CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um segundo domínio Fc variante; c) um terceiro monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL; em que os ditos domínios VH e VL formam um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

[0020] Em aspectos adicionais, a invenção fornece composições de ácido nucleico que compreendem: a) um primeiro ácido nucleico que codifica o primeiro monômero das modalidades; b) um segundo ácido nucleico que codifica o segundo monômero das modalidades; e c) um terceiro ácido nucleico que codifica o terceiro monômero das modalidades.

[0021] Em outros aspectos, a invenção fornece composições de vetor de expressão que compreende: a) um vetor de expressão que compreende os primeiros ácidos nucleicos; b) um vetor de expressão que compreende os segundos ácidos nucleicos; e c) um vetor de expressão que compreende os terceiros ácidos nucleicos.

[0022] Em um aspecto adicional, a invenção fornece células hospedeiras que compreendem as composições do vetor de expressão.

[0023] Em um aspecto adicional, a invenção fornece métodos de produção das proteínas de fusão Fc heterodiméricas IL-15/Rα direcionadas da invenção, sendo que o método compreende: cultivar as células hospedeiras sob condições em que a dita proteína de fusão Fc heterodimérica IL-15/Rα direcionada é expressa; e recuperar a dita proteína.

[0024] Em um aspecto adicional, a invenção fornece métodos de tratamento de um câncer que compreendem a administração a um paciente em necessidade dos mesmos de uma composição farmacêutica que compreende

as proteínas de fusão Fc heterodiméricas IL-15/Rα direcionadas da invenção.

[0025] Em um aspecto adicional, a invenção fornece métodos de tratamento de um câncer que compreendem a administração a um paciente em necessidade dos mesmos de uma composição farmacêutica que compreende as proteínas de fusão Fc heterodiméricas IL-15/Rα direcionadas da invenção em combinação com um anticorpo anti-PD-1 incluindo nivolumabe ou pembrolizumabe.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0026] As Figuras 1A a 1B retratam as sequências para IL-15 e seus receptores.

[0027] A Figura 2 retrata as sequências de PD-1 para ambos humanos e macacos cinomolgos para facilitar o desenvolvimento de domínios de ligação ao antígeno que se ligam a ambos para facilitar o desenvolvimento clínico.

[0028] As Figuras 3A a 3E retratam pares úteis de conjuntos de variantes de heterodimerização Fc (que incluem variantes de enviesamento e pI). Essas são variantes para as quais não há variantes de "monômero 2" correspondentes; essas são as variantes de pI que podem ser usadas sozinhas em qualquer monômero.

[0029] A Figura 4 retrata uma lista de regiões constantes do anticorpo variante isostérico e suas respectivas substituições. pI _(-) indica variantes de pI mais baixo, enquanto pI _(+) indica variantes de pI mais alto. Essas podem ser opcional e independentemente combinadas com outras variantes de heterodimerização da invenção (e outros tipos de variante, como delineado no presente documento).

[0030] A Figura 5 retrata variantes úteis de ablação que eliminam a ligação de FcγR (por vezes denominadas variantes de "knockouts" ou "KO"). Geralmente, variantes de ablação são encontradas em ambos os monômeros, embora em alguns casos possam estar em apenas um monômero.

[0031] As Figuras 6A a 6E mostram uma modalidade particularmente útil dos componentes “não citocina” das proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc da invenção.

[0032] As Figuras 7A a 7F mostram modalidades particularmente úteis de componentes “não citocina”/”não Fv” das proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção.

[0033] A Figura 8 retrata vários ligantes de comprimento variáveis exemplificativas para uso nas proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc. Em algumas modalidades, esses ligantes são usados na ligação do terminal C de IL-15 e/ou IL-15Rα(sushi) ao terminal N da região Fc. Em algumas modalidades, esses ligantes são usados na fusão de IL-15 com a IL-15Rα(sushi).

[0034] As Figuras 9A a 9C retratam vários ligantes scFv carregados que são úteis no aumento ou na diminuição do pI de proteínas de fusão heterodiméricas que utilizam um ou mais scFv como um componente. O ligante positivo (+H) é particularmente útil no presente documento. Um único ligante scFv de técnica anterior com carga única é denominado de “Whitlow”, de Whitlow et al., Protein Engineering 6(8): 989 a 995 (1993). Deve-se verificar que esse ligante foi usado para reduzir agregação e intensificar estabilidade proteolítica em scFvs. Em algumas modalidades, esses ligantes são usados na ligação do terminal C de IL-15 e/ou IL-15Rα(sushi) ao terminal N da região Fc; e/ou na fusão de IL-15 à IL-15Rα(sushi).

[0035] As Figuras 10A a 10D mostram as sequências de várias estruturas principais de formato IL-15/Rα-Fc úteis com base em IgG1 humana, sem as sequências de citocinas (por exemplo, a IL-15 e/ou a IL-15Rα(sushi)). É importante verificar que essas estruturas principais também podem ser úteis em determinadas modalidades de proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1. A estrutura principal 1 é baseada em IgG1 humana (alótipo 356E/358M) e inclui C220S em ambas as cadeias, variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S, as variantes de pI

Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com variantes de enviesamento L368D/K370S e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias. A estrutura principal 2 é baseada em IgG1 humana (alótipo 356E/358M), e inclui C220S em ambas as cadeias, variantes de enviesamento S364K : L368D/K370S, as variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com variantes de enviesamento L368D/K370S e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias. A estrutura principal 3 é baseada em IgG1 humana (alótipo 356E/358M), e inclui C220S em ambas as cadeias, variantes de enviesamento S364K : L368E/K370S, as variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com variantes de enviesamento L368E/K370S e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias. A estrutura principal 4 é baseada em IgG1 humana (alótipo 356E/358M), e inclui C220S em ambas as cadeias, variantes de enviesamento D401K : K360E/Q362E/T411E, as variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com variantes de enviesamento K360E/Q362E/T411E e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias. A estrutura principal 5 é baseada em IgG1 humana (alótipo 356D/358L), e inclui C220S em ambas as cadeias, variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S, as variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com variantes de enviesamento L368D/K370S e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias. A estrutura principal 6 é baseada em IgG1 humana (alótipo 356E/358M), e inclui C220S em ambas as cadeias, variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S, as variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com variantes de enviesamento L368D/K370S e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias, assim como uma variante N297A em ambas as cadeias. A estrutura principal 7 é idêntica à

6, exceto que a mutação é N297S. Os formatos alternativos para as estruturas principais 6 e 7 podem excluir as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias. A estrutura principal 8 é baseada em IgG4 humana e inclui as variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S, as variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com variantes de enviesamento L368D/K370S, assim como uma variante S228P (numeração UE, isto é, S241P em Kabat) em ambas as cadeias que eliminam a troca de braço Fab como conhecido na técnica. A estrutura principal 9 é baseada em IgG2 humana e inclui as variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S, as variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com variantes de enviesamento L368D/K370S. A estrutura principal 10 é baseada em IgG2 humana e inclui as variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S, as variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com variantes de enviesamento L368D/K370S, assim como uma variante S267K em ambas as cadeias. A estrutura principal 11 é idêntica à estrutura principal 1, exceto que inclui mutações M428L/N434S Xtend. A estrutura principal 12 é baseada em IgG1 humana (alótipo 356E/358M) e inclui C220S em ambas as cadeias idênticas, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias idênticas. A estrutura principal 13 é baseada em IgG1 humana (alótipo 356E/358M) e inclui C220S em ambas as cadeias, variantes de enviesamento S364K/E357Q : S364K/E357Q, as variantes de pI P217R/P228R/N276K na cadeia com variantes de enviesamento L368D/K370S e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias.

[0036] Como será observado pelas pessoas versadas na técnica e delineado abaixo, essas sequências podem ser usadas com quaisquer pares de IL-15 e IL-15Rα(sushi) delineados no presente documento, incluindo, porém sem limitação, IL-15/Rα-heteroFc, ncIL-15/Rα e scIL-15/Rα, como retratado

esquematicamente nas Figuras 14A a 14G. Adicionalmente, quaisquer variantes de IL-15 e/ou IL-15Rα(sushi) podem ser incorporadas nessas estruturas principais das Figuras 11A a 11C em qualquer combinação.

[0037] Incluídas em cada uma dessas estruturas principais estão sequências que são 90, 95, 98 e 99% idênticas (como definido no presente documento) às sequências recitadas e/ou que contêm de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições de aminoácidos adicionais (em comparação ao "parental" da Figura, que, como será observado pelas pessoas na técnica, já contém várias modificações de aminoácido em comparação à IgG1 humana parental (ou IgG2 ou IgG4, dependendo da estrutural principal). Ou seja, as estruturas principais recitadas podem conter modificações de aminoácido adicionais (geralmente substituições de aminoácidos) além das variantes de enviesamento, de pI e de ablação contidas dentro das estruturas principais dessa Figura.

[0038] A Figura 11 mostra as sequências de diversas estruturas principais em formato de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 úteis com base na IgG1 humana, sem as sequências de citocinas (por exemplo, a Il-15 e/ou a IL-15Rα(sushi)) ou VH, e excluindo adicionalmente as estruturas principais de cadeia leve que são retratadas na Figura 12. A estrutura principal 1 se baseia em IgG1 humana (alótipo de 356E/358M) e inclui as variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S, C220S e as variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com variantes de enviesamento L368D/K370S e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias. A estrutura principal 2 se baseia na IgG1 humana (alótipo 356E/358M) e inclui as variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S, as variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D na cadeia com as variantes de enviesamento L368D/K370S, C220S na cadeia com variantes S364K/E357Q e as variantes de ablação em ambas as cadeias

E233P/L234V/L235A/G236del/S267K. A estrutura principal 3 se baseia na IgG1 humana (alótipo 356E/358M) e inclui as variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S, as variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D nas cadeias com variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de pI Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K nas cadeias com variantes S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K em ambas as cadeias.

[0039] Em determinadas modalidades, essas sequências podem ser do alótipo 356D/358L. Em outras modalidades, essas sequências pode incluir ou qualquer uma das substituições N297A ou N297S. Em algumas outras modalidades, essas sequências podem incluir as mutações M428L/N434S Xtend. Em ainda outras modalidades, essa sequências podem se basear, de preferência, em IgG4 humana e incluir uma variante S228P (numeração EU, essa é S241P em Kabat) em ambas as cadeias que causam ablação na troca de braço de Fab, como é conhecido na técnica. Em modalidades ainda adicionais, essas sequências pode se basear, de preferência, na IgG2 humana. Além disso, essas sequências podem utilizar, de preferência, as outras variantes de enviesamento, variantes de pI e as variantes de ablação retratadas nas Figuras 4A a 4E, 5 e 6.

[0040] Como será observado pelas pessoas versadas na técnica e delineadas abaixo, essas sequências podem ser usadas com quaisquer partes de IL-15 e IL-15Rα(sushi) delineadas no presente documento, incluindo, porém sem limitação, scIL-15/Rα, ncIL-15/Rα e dsIL-15Rα, como relatado esquematicamente nas Figuras 34A a 34H. Além disso, como será observado pelas pessoas versadas a técnica, quaisquer variantes de IL-15 e/ou IL-15Rα(sushi) podem ser incorporadas nessas estruturas principais. Além disso, como será observado pelas pessoas versadas na técnica e delineado abaixo, essas sequências podem ser usadas com quaisquer pares de VH e VL

delineados no presente documento, incluindo ou um scFv ou um Fab.

[0041] Incluídas em cada uma dessas estruturas principais estão sequências que são 90, 95, 98 e 99% idênticas (como definido no presente documento) às sequências recitadas e/ou que contêm de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições de aminoácidos adicionais (em comparação ao "parental" da Figura, que, como será observado pelas pessoas na técnica, já contém várias modificações de aminoácido em comparação à IgG1 humana parental (ou IgG2 ou IgG4, dependendo da estrutural principal). Ou seja, as estruturas principais recitadas podem conter modificações de aminoácido adicionais (geralmente substituições de aminoácidos) além das variantes de enviesamento, de pI e de ablação contidas dentro das estruturas principais dessa Figura.

[0042] A Figura 12 retrata a estrutural principal "não Fv" de cadeias leves (isto é, cadeia leve constante) que são úteis nas proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção.

[0043] As Figuras 13A a 13G retratam vários formatos para as proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc não direcionadas da presente invenção. A fusão Fc heterodimérica de IL-15Rα ou "IL-15/Rα-heteroFc" (Figura 13A) compreende IL-15 fundida de modo recombinante a um lado de um Fc heterodimérico e IL-15Rα(sushi) fundida de modo recombinante ao outro lado de um Fc heterodimérico. A IL-15 e a IL-15Rα(sushi) podem ter um ligante Gly-Ser de comprimento variável entre o terminal C e o terminal N da região Fc. A fusão de IL-15/Rα-Fc de cadeia simples ou "ScIL-15/Rα-Fc" (Figura 13B) compreende IL-15Rα(Sushi) fundida com IL-15 por um ligante de comprimento variável (denominado complexo de IL-15/IL-15Rα(sushi) de "cadeia simples" ou "scIL-15/Rα") que é, então, fundida ao terminal N de uma região Fc heterodimérica, em que o outro lado da molécula é "apenas Fc" ou "Fc vazio". A IL-15/Rα-Fc não covalente ou "ncIL-15/Rα-Fc" (Figura 13C) compreende IL-15Rα(sushi) fundida a uma região Fc heterodimérica,

enquanto IL-15 é transfectada separadamente de modo que um complexo de IL-15/Rα não covalente seja formado, em que o outro lado da molécula é "apenas Fc" ou "Fc vazio". A fusão de IL-15/Rα-Fc não covalente bivalente ou "ncIL-15/Rα-Fc bivalente" (Figura 13D) compreende IL-15Rα(sushi) fundida com o terminal N de uma região Fc homodimérica, enquanto IL-15 é transfectada separadamente de modo que um complexo de IL-15/Rα não covalente seja formado. A fusão de IL-15/Rα-Fc de cadeia única bivalente ou "scIL-15/Rα-Fc bivalente" (Figura 13E) compreende IL-15 fundida com IL-15Rα(sushi) por um ligante de comprimento variável (denominado complexo de IL-15/IL-15Rα(sushi) de "cadeia única" ou "scIL-15/Rα") que é, então, fundido ao terminal N de uma região Fc homodimérica. A fusão de IL-15/Rα-não covalente-bivalente ou "Fc-ncIL-15/Rα" (Figura 13F) compreende IL-15Rα(Sushi) fundida com o terminal C de uma região Fc heterodimérica, enquanto a IL-15 é transfectada separadamente de modo que um complexo de IL-15/Rα não covalente seja formado, em que o outro lado da molécula é "apenas Fc" ou "Fc vazio". A fusão IL-15/Rα de cadeia única Fc ou "Fc-scIL-15/Rα" (Figura 13G) compreende IL-15 fundida com IL-15Rα(sushi) por um ligante de comprimento variável (denominado complexo de "cadeia simples" IL-15/IL-15Rα(sushi) ou "scIL-15/Rα") que é então fundido ao terminal C de uma região Fc heterodimérica, com o outro lado da molécula sendo "apenas Fc" ou "Fc vazio".

[0044] A Figura 14 retrata sequências de proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc ilustrativas do formato "IL-15/Rα-heteroFc" não direcionado. IL-15 e IL-15Rα(sushi) estão sublinhadas, os ligantes são duplamente sublinhados (embora, como será apreciado pelos especialistas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, alguns dos quais estão retratados nas Figuras 8 e 9), e barras (/) indicam o limite (ou limites) entre as IL-15, IL-15Rα, ligantes e regiões Fc.

[0045] A Figura 15 retrata sequências de uma proteína de fusão IL-

15/Rα-Fc ilustrativa do formato “scIL-15/Rα-Fc bivalente”. IL-15 e IL-15Rα(sushi) estão sublinhadas, os ligantes são duplamente sublinhados (embora, como será apreciado pelos especialistas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, alguns dos quais estão retratados nas Figuras 8 e 9), e barras (/) indicam o limite (ou limites) entre as IL-15, IL-15Rα, ligantes e regiões Fc.

[0046] A Figura 16 retrata sequências de proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc ilustrativas do formato “ncIL-15/Rα-Fc” não direcionado. IL-15 e IL-15Rα(sushi) estão sublinhadas, os ligantes são duplamente sublinhados (embora, como será apreciado pelos especialistas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, alguns dos quais estão retratados nas Figuras 8 e 9), e barras (/) indicam o limite (ou limites) entre as IL-15, IL-15Rα, ligantes e regiões Fc.

[0047] As Figuras 17A a 17C retratam a introdução da proliferação de A) células NK ($CD56^+/CD16^+$), B) células T $CD4^+$ e C) de células T $CD8^+$ por proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc ilustrativas do formato scIL-15/Rα-Fc (XENP21478) e do formato ncIL-15/Rα-Fc (XENP21479) com base na expressão de Ki67, como medido por FACS.

[0048] A Figura 18 retrata a estrutura de IL-15 complexada com IL-15Rα, IL-2Rß e cadeia gama comum. Locais de substituições projetados para reduzir a potência são mostrados.

[0049] As Figuras 19A a 19C retratam sequências para variantes ilustrativas de IL-15 projetadas com o objetivo de reduzir a potência. Incluídas em cada uma dessas sequências de IL-15 variante estão sequências que são 90, 95, 98 e 99% idênticas (como definido no presente documento) às sequências recitadas e/ou que contêm de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições de aminoácidos adicionais. Como será claro para os versados na técnica, as variantes de IL-15 podem ser usadas em qualquer uma das proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc e IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 aqui

descritas.

[0050] A Figura 20 retrata sequências de proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc ilustrativas (por exemplo, construtos não direcionados) do formato "IL-15/Rα-heteroFc não direcionado" que compreende variantes de IL-15 projetadas com o objetivo de reduzir a potência. IL-15 e IL-15Rα(sushi) estão sublinhadas, os ligantes são duplamente sublinhados (embora, como será apreciado pelos especialistas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, alguns dos quais estão retratados nas Figuras 8 e 9), e barras (/) indicam o limite (ou limites) entre as IL-15, IL-15Rα, ligantes e regiões Fc.

[0051] As Figura 21A a 21B retratam sequências de proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc ilustrativas do formato "scIL-15/Rα-Fc" não direcionado que compreende variantes de IL-15 projetadas com o objetivo de reduzir a potência. IL-15 e IL-15Rα(sushi) estão sublinhadas, os ligantes são duplamente sublinhados (embora, como será apreciado pelos especialistas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, alguns dos quais estão retratados nas Figuras 8 e 9), e barras (/) indicam o limite (ou limites) entre as IL-15, IL-15Rα, ligantes e regiões Fc.

[0052] As Figuras 22A a 22B retratam a porcentagem de A) células $CD4^+CD45RA^-$ e b) células $CD8^+CD45RA^-$ que expressam Ki67 após incubação com os artigos de teste indicados.

[0053] A Figura 23 retrata as sequências de aminoácidos de XENP15074 (um mAb anti-RSV bivalente baseado em motavizumabe e IgG1 Fc humano com substituições E233P/L234V/L235A/G236del/S267K). As CDRs estão sublinhadas e as barras indicam as bordas das regiões variáveis.

[0054] A Figura 24 retrata as sequências de aminoácidos de A) XENP16432 (um mAb anti-PD-1 bivalente com base em nivolumabe e IgG1 Fc humano com substituições E233P/L234V/L235A/G236del/S267K) B) XENP21641 (pembrolizumabe), e C) XENP28437 (um mAb anti-PD-1

bivalente baseado em pembrolizumabe e IgG1 Fc humano com substituições E233P/L234V/L235A/G236del/S267K). As CDRs estão sublinhadas e as barras indicam as bordas das regiões variáveis.

[0055] A Figura 25 retrata as sequências para XENP21575, um anticorpo anti-PD-1 quimérico e humanizado com base nas regiões variáveis do clone 1C11 de hibridoma e da IgG1 humana com substituições de E233P/L234V/L235A/G236del/S267K na cadeia pesada. As CDRs estão em negrito, e as barras indicam as bordas dos domínios variáveis. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que são sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. Como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os domínios V_H e V_L podem ser formatados como Fab ou scFvs para uso nas proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção.

[0056] A Figura 26 retrata as sequências para variantes humanizadas ilustrativas de mAb A e mAb B anti-PD-1 no formato de IgG1 humana bivalente com substituições E233P/L234V/L235A/G236del/S267K na cadeia pesada. As CDRs estão em negrito, e as barras indicam as bordas dos domínios variáveis. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que são sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. Como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os domínios V_H e V_L podem ser formatados

como Fab ou scFvs para uso nas proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção.

[0057] A Figura 27 retrata o agrupamento de sequências (binning) de epítopo de XENP16432 (um mAb anti-PD-1 bivalente baseado em nivolumabe), XENP21461 (pembrolizumabe), mAb A quimérico (chmAb A), mAb B quimérico (chmAb B) e um mAb baseado em 1C11 normalizado como indicado por Octeto de resposta BLI. A resposta BLI normalizada maior que 0,5 indica que um par de anticorpos não se classifica para o mesmo epítopo.

[0058] As Figuras 28A a 28H retratam vários formatos para as proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 da presente invenção. O formato "scIL-15/Rα x scFv" (Figura 28A) compreende IL-15Rα(sushi) fundida à IL-15 por um ligante de comprimento variável (denominado de "scIL-15/Rα") que é, em seguida, fundido ao terminal N de uma região Fc heterodimérica, com um scFv fundido ao outro lado do heterodimérico Fc. O formato "scFv x ncIL-15/Rα" (Figura 28B) compreende um scFv fundido ao terminal N de uma região Fc heterodimérica, com IL-15Rα(sushi) fundida ao outro lado do heterodimérico Fc, ao passo que a IL-15 é submetida à transfecção separadamente de modo que um complexo IL-15/Rα não covalente seja formado. O formato "scIL-15/Rα x Fab" (Figura 28C) compreende IL-15Rα(sushi) fundida à IL-15 por um ligante de comprimento variável (chamado "scIL-15/Rα") que é, em seguida, fundido ao terminal N de uma região Fc heterodimérica, com uma cadeia pesada variável (VH) fundida ao outro lado do heterodimérico Fc, ao mesmo tempo que uma cadeia leve correspondente é submetida à transfecção separadamente de modo a formar um Fab com o VH. O formato "ncIL-15/Rα x Fab" (Figura 28D) compreende um VH fundido ao terminal N de uma região Fc heterodimérica, com IL-15Rα(sushi) fundida ao outro lado do heterodimérico Fc, ao passo que uma cadeia leve correspondente é submetida à transfecção separadamente

de modo a formar um Fab com o VH, e ao passo que a IL-15 é submetida à transfecção separadamente de modo que um complexo IL-15/Rα não covalente seja formado. O formato “mAb-scIL-15/Rα” (Figura 28E) compreende VH fundido ao terminal N de um primeiro e segundo Fc heterodiméricos, em que a IL-15 é fundida à IL-15Rα(sushi) que é, em seguida, fundida adicionalmente ao terminal C de uma dentre a região Fc heterodimérica, ao passo que cadeias leves correspondentes são submetidas à transfecção separadamente de modo a formar um Fabs com os VHs. O formato “mAb-ncIL-15/Rα” (Figura 28F) compreende VH fundido ao terminal N de um primeiro e um segundo Fc heterodimérico, com a IL-15Rα(sushi) fundida ao terminal C de uma dentre a região Fc heterodimérica, ao mesmo tempo que cadeias leves correspondentes são submetidas à transfecção separadamente de modo a formar um Fabs com os VHs, e ao mesmo tempo que a IL-15 é submetida à transfecção separadamente de modo que um complexo IL-15/Rα não covalente é formado. O formato “central-IL-15/Rα” (Figura 28G) compreende um VH fundido de maneira recombinante ao terminal N da IL-15 que é, em seguida, fundido adicionalmente a um lado de um Fc heterodimérico e um VH fundido de maneira recombinante ao terminal N da IL-15Rα(sushi) que é, em seguida, fundida adicionalmente ao outro lado do Fc heterodimérico, ao mesmo tempo que cadeias leves correspondentes são submetidas à transfecção separadamente de modo a formar um Fabs com os VHs. O formato “central-scIL-15/Rα” (Figura 28H) compreende um VH fundido ao terminal N de IL-15Rα(sushi) que é fundido a IL-15 que é, em seguida, fundido adicionalmente a um lado de um Fc heterodimérico e um VH fundido ao outro lado do Fc heterodimérico, ao passo que as cadeias leves correspondentes são submetidas à transfecção separadamente de modo a formar um Fabs com os VHs.

[0059] A Figura 29 retrata sequências de proteínas ilustrativas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a [C]PD-1 do formato “scIL-15/Rα x Fab”.

As CDRs estão em negrito. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que estão sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. IL-15 e IL-15Rα(sushi) estão em itálico, os ligantes são sublinhados duas vezes (embora, como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, dentre os quais alguns são retratados nas Figuras 8 e 9), e as barras (/) indicam o limite (ou limites) entre IL-15, IL-15Rα, ligantes, regiões variáveis e regiões constantes/Fc. Como será claro para os versados na técnica, cada uma das proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas descritas pode incluir ou excluir Xtend Fc (M428L/N434S).

[0060] A Figura 30 retrata sequências de proteínas ilustrativas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 do formato “scIL-15/Rα x Fab”. As CDRs são sublinhadas. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que estão sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. IL-15 e IL-15Rα(sushi) estão em itálico, os ligantes são sublinhados duas vezes (embora, como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, dentre os quais alguns são retratados nas Figuras 8 e 9), e as barras (/) indicam o limite (ou limites) entre IL-15, IL-15Rα, ligantes, regiões variáveis e regiões constantes/Fc. Como será claro para os versados na técnica, cada uma das proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas descritas

pode incluir ou excluir Xtend Fc (M428L/N434S).

[0061] As Figuras 31A a 31D retratam as sequências de controle de fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a RSV. As CDRs são sublinhadas. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que estão sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. IL-15 e IL-15Rα(sushi) estão em itálico, os ligantes são sublinhados duas vezes (embora, como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, dentre os quais alguns são retratados nas Figuras 8 e 9), e as barras (/) indicam o limite (ou limites) entre IL-15, IL-15Rα, ligantes, regiões variáveis e regiões constantes/Fc. Como será claro para os versados na técnica, cada uma das proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas descritas também pode excluir ou incluir Xtend Fc (M428L/N434S).

[0062] As Figuras 32A e 32B retratam a proliferação de A) células T $CD8^+$ e B) células T $CD4^+$ após incubação com IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 (XENP28532, XENP28692 e XENP25850), bem como Fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV de controle (XENP26007) e mAb anti-PD-1 (XENP28519).

[0063] As Figuras 33A a 33B retratam a indução de fosforilação de STAT5 em A) $CD4^+CD45RA^-CD25^+$ e B) $CD8^+CD45RA^-CD25^+$ por XENP25850 (uma fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 ilustrativa). As células frescas são indicadas em linhas pontilhadas e as células ativadas são indicadas em linhas sólidas. As células frescas são todas $CD25^-$.

[0064] As Figuras 34A a 34B retratam a indução de fosforilação de STAT5 em células T $CD8^+CD45RA^-CD25^+PD\text{-}1^+$ por A) XENP25937 de

fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [C]PD-1e B) XENP28532 de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 após pré-incubação com XENP16432 à base de nivolumabe, pembrolizumabe ou mAb anti-RSV XENP15074.

[0065] A Figura 35 retrata a mudança no peso corporal de camundongos NSG enxertados com huPBMC ao longo do tempo (como uma porcentagem do peso corporal inicial) após a dosagem com os artigos de teste indicados.

[0066] As Figuras 36A a 36B retratam A) contagens de células T $CD8^+$ e B) contagens de células T $CD4^+$ no dia 14 após a primeira dose dos artigos de teste indicados em camundongos NSG enxertados com PBMC humanas.

[0067] As Figuras 37A a 37B retratam a expressão de CD25 em A) células T $CD8^+$ e B) células T $CD4^+$ no Dia 10 após a primeira dose dos artigos de teste indicados em camundongos NSG enxertados com PBMC humanas.

[0068] A Figura 38 retrata a razão entre células T $CD8^+$ e células T $CD4^+$ no Dia 10 após a primeira dose dos artigos de teste indicados em camundongos NSG enxertados com PBMC humanas.

[0069] As Figuras 39A a 39B retratam A) contagens de células T $CD8^+$ e B) contagens de células T $CD4^+$ no Dia 10 após a primeira dose dos artigos de teste indicados em camundongos NSG enxertados com PBMC humanas.

[0070] As Figuras 40A e 40B retratam a expressão de CD25 em A) células T $CD8^+$ e B) células T $CD4^+$ no Dia 10 após a primeira dose dos artigos de teste indicados em camundongos NSG enxertados com PBMC humanas.

[0071] A Figura 41 retrata a concentração sérica dos artigos de teste indicados ao longo do tempo em macacos cynomolgus após uma primeira dose nas concentrações relativas indicadas. Figura 42

[0072] A Figura 42 retrata as sequências de XENP29484 e XENP29485, proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 ilustrativas tendo a variante IL-15 (D30N/N65D). As CDRs são sublinhadas. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que estão sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. IL-15 e IL-15Rα(sushi) estão em itálico, os ligantes são sublinhados duas vezes (embora, como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, dentre os quais alguns são retratados nas Figuras), e as barras (/) indicam o limite (ou limites) entre IL-15, IL-15Rα, ligantes, regiões variáveis e regiões constantes/Fc.

[0073] As Figuras 43A a 43X retratam as cadeias pesadas variáveis e leves variáveis para ABDs anti-PD-1 ilustrativos adicionais que não competem com nivolumabe nem pembrolizumabe. As CDRs são sublinhadas. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que estão sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração.

[0074] A Figura 44A a 44B retrata a porcentagem de PD-1 $^{+}$ A) células T $CD8^{+}CD45RA^{-}CD45RO^{+}$ e B) células T $CD4^{+}CD45RA^{-}CD45RO^{+}$ após tratamento com XENP28532 de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 bem como XENP24306 de controle (fusão de IL-15/Rα-Fc não direcionada)

e XENP26007 (fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV).

[0075] A Figura 45 retrata as sequências para variantes humanizadas ilustrativas de mAb A e mAb B anti-PD-1 no formato de IgG1 humana bivalente com substituições E233P/L234V/L235A/G236del/S267K na cadeia pesada. As CDRs estão em negrito, e as barras indicam as bordas dos domínios variáveis. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que são sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. Como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os domínios V_H e V_L podem ser formatados como Fab ou scFvs para uso nas proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção.

[0076] A Figura 46 retrata a afinidade de XENP28536, XENP28537, XENP28538, XENP28539 e XENP28519 para seres humanos e PD-1 cynomolgus como determinado pelo Octeto.

[0077] A Figura 47 retrata o binning de epítopo de XENP16432 (um mAb anti-PD-1 bivalente baseado em nivolumabe), XENP21461 (pembrolizumabe) e mAb C quimérico (chmAb C). A resposta BLI normalizada maior que 0,5 indica que um par de anticorpos não se classifica para o mesmo epítopo. Os dados indicam que o mAb C anti-PD-1 não se associa ao mesmo epítopo que o nivolumabe e o pembrolizumabe.

[0078] As Figuras 48A a 48C retratam sequências de proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 ilustrativas do formato “scIL-15/Rα x Fab” que compreende braço direcionado a PD-1 com base em mAb C e várias variantes de potência de IL-15. As CDRs são sublinhadas. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no

presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que estão sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. Os ligantes são duplamente sublinhados (embora, como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, dentre os quais alguns são retratados nas Figuras 65 e 66), e as barras (/) indicam o limite (ou limites) entre IL-15, IL-15Rα, ligantes, regiões variáveis e regiões constantes/Fc. Como será claro para os versados na técnica, cada uma das proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 descritas também pode excluir ou incluir Xtend Fc (M428L/N434S).

[0079] As Figuras 49A a 49C retratam sequências de proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 ilustrativas do formato “scIL-15/Rα x Fab” que compreende braço direcionado a PD-1 com base em mAb C e várias variantes de potência de IL-15, que compreende adicionalmente Xtend Fc (M428L/N434S). As CDRs são sublinhadas. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que estão sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. Os ligantes são duplamente sublinhados (embora, como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, dentre os quais alguns são retratados nas Figuras 65 e 66), e as barras (/) indicam o limite (ou limites) entre IL-15, IL-15Rα, ligantes, regiões variáveis e regiões constantes/Fc.

[0080] A Figura 50 retrata a indução de A) células T $CD8^+$ e B) proliferação de células T $CD4^+$ por fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 (e controles) como indicado pela porcentagem de células em proliferação (determinado com base na diluição de CFSE). Os dados mostram que as fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 foram mais potentes na indução da proliferação de células T $CD4^+$ em comparação com a fusão de IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc não direcionada (bem como a fusão de controle de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV).

[0081] A Figura 51 retrata a indução de células T $CD8^+$ LAG-3-positivas por fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 (e controles) como indicado pela porcentagem de células em proliferação (determinado com base na diluição de CFSE). Os dados mostram que XENP28532 foi mais potente na indução da proliferação de células T $CD8^+LAG\text{-}3^+$ em comparação com a fusão de IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc não direcionada (bem como fusão de controle de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV). Além disso, o XENP28543 foi mais potente na indução da proliferação de células T $CD8^+LAG\text{-}3^+$ do que a proliferação de células T $CD8^+$ em massa (EC50 276,8 vs. 71,94). Coletivamente, isso suporta a noção de que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 podem ser seletivas para células T que expressam pontos de verificação como aqueles que seriam encontrados no ambiente do tumor.

[0082] A Figura 52 retrata a ativação de A) células T $CD4^+CD45RA^-$ de memória e B) células T virgens $CD4^+CD45RA^+$ após incubação com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 (e controles) como indicado pela porcentagem de células expressando CD25.

[0083] A Figura 53 retrata a porcentagem de A) células T $CD4^+CD45RA^-$ e B) células T $CD4^+CD45RA^+$ que expressam PD-1 após incubação com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 (e controles).

[0084] A Figura 54 descreve a secreção de IFNγ por PBMC pré-

estimulada com A) 50 ng/ml, B) 100 ng/ml e C) 500 ng/ml de anti-CD3 ligado à placa (OKT3) e incubada com os artigos de teste indicados. Os dados mostram que tanto o XENP28532 quanto o XENP28543 foram capazes de estimular potentemente a secreção de IFNγ. Notavelmente, XENP28532 (braço direcionado a PD-1 com base no mAb A) pareceu mais ativo do que XENP28543 (braço direcionado a PD-1 com base no mAb C) na indução da secreção de IFNγ.

[0085] A Figura 55 retrata a indução de fosforilação de STAT5 em A) células T $CD8^+CD45RA^-CD25^+PD\text{-}1^+$ e B) células T $CD4^+CD45RA^-CD25^+PD\text{-}1^+$ por XENP28543, fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 com braço direcionado a PD-1 com base no mAb C, após pré-incubação com XENP16432 à base de nivolumabe, pembrolizumabe ou mAb anti-RSV XENP15074. Os dados indicam que o bloqueio de PD-1 não interfere com a atividade de XENP28543.

[0086] A Figura 56 retrata a mudança no peso corporal em camundongos NSG enxertados com huPBMC ao longo do tempo (como uma porcentagem do peso corporal inicial) após a dosagem com os artigos de teste indicados.

[0087] A Figura 57 retrata o peso corporal de camundongos NSG enxertados com huPBMC (como uma porcentagem do peso corporal inicial) nos dias A) 11, B) 14 e C) 18 após a primeira dose com os artigos de teste indicados. Os valores de p foram determinados usando o teste t não pareado. Os dados mostram que, no Dia 11, a combinação de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 com o bloqueio de PD-1 aumentou significativamente a GVHD em relação ao tratamento com fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 sozinha.

[0088] A Figura 58 retrata o número de células humanas A) $CD45^+$, B) células T $CD3^+$, C) células T $CD4^+$, D) células T $CD8^+$, E) células T γδ e F) células NK no sangue de camundongos NSG enxertados com huPBMC no

Dia 14 após a primeira dose com os artigos de teste indicados.

[0089] A Figura 59 retrata a ativação de células T $CD8^+$ humanas A) e B) células T $CD4^+$ (como indicado por CD25 MFI) no sangue de camundongos NSG enxertados com huPBMC no dia 14 após a primeira dose com os artigos de teste indicados.

[0090] A Figura 60 retrata o volume do tumor (como determinado por medições de calibrador) ao longo do tempo em camundongos NSG enxertados com pp65-MCF7 e huPBMC doseados com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1, sozinhas ou em combinação com bloqueio de PD-1.

[0091] A Figura 61 retrata o volume do tumor (como determinado por medições de calibrador) nos Dias 26, 28, 30, 33, 35 e 37 (após enxerto de PBMC e primeira dose de artigos de teste) em camundongos NSG enxertados com pp65-MCF7 e huPBMC doseados com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1, sozinhas ou em combinação com bloqueio de PD-1. Os valores p foram determinados por teste t não pareado. Os dados mostram que, no dia 28, a combinação de XENP28543 com o bloqueio de PD-1 reduziu significativamente o tamanho do tumor em relação ao tratamento com o bloqueio de PD-1 sozinho.

[0092] A Figura 62 retrata a ativação de células T $CD8^+$ humanas A) e B) células T $CD4^+$ (como indicado por CD25 MFI) no sangue de camundongos NSG enxertados com pp65-MCF7 e huPBMC no Dia 7 após a primeira dose com os artigos de teste indicados. Os dados mostram que as fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1, sozinhas ou em combinação com o bloqueio de PD-1, possibilitaram uma ativação precoce significativamente aumentada de células T $CD8^+$. As estatísticas foram realizadas em dados transformados em log usando o teste t desemparelhado.

[0093] A Figura 63 retrata o número de células humanas A) $CD45^+$, B) células T $CD3^+$, C) células T $CD4^+$, D) células T $CD8^+$ e E) células NK no

sangue de camundongos NSG enxertados com pp65-MCF7 e huPBMC no dia 14 após a primeira dose com artigos de teste indicados. Os dados mostram que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1, sozinhas ou em combinação com o bloqueio de PD-1, permitiram a expansão significativamente aumentada de numerosas populações de linfócitos no Dia 14 sobre o bloqueio de PD-1 sozinho. As estatísticas foram realizadas em dados transformados em log usando o teste t desemparelhado.

[0094] A Figura 64 retrata as sequências para variantes ilustrativas projetadas por afinidade de mAb C anti-PD-1 em formato IgG1 humano bivalente com substituições E233P/L234V/L235A/G236del/S267K na cadeia pesada. As CDRs estão em negrito, e as barras indicam as bordas dos domínios variáveis. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que são sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. Como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os domínios V_H e V_L podem ser formatados como Fab ou scFvs para uso nas proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção.

[0095] As Figuras 65A a 65I retratam a constante de dissociação aparente (K_{Dapp}), a taxa de associação (k_a) e a taxa de dissociação (k_d) de variantes de mAb C[PD-1]_H1L1 projetadas por afinidade (em formato de IgG1 bivalente com variantes de ablação de E233P/L234V/L235A/G236_/S267K) como determinado pelo octeto, bem como melhoria de dobra em relação a mAb C[PD-1]_H1L1. As substituições em regiões variáveis pesadas ou variáveis leves, quando listadas, são baseadas na numeração Xencor (com a posição Kabat correspondente listada na

próxima coluna). De 304 variantes com mutação de ponto único na região variável pesada ou variável leve, identificamos apenas 11 variantes (incluindo mAb C[PD-1]_H1_L1.1 e mab_C[PD-1]_H1_L1.3) com afinidade aprimorada mais que 2 vezes em relação ao WT. Deve-se notar que, para a coluna de número de Kabat, algumas posições são numeradas usando letras também; por exemplo, na numeração de Kabat, há um aminoácido na posição 27d (N27d), mas um aminoácido diferente na posição 27e (S27e); ou seja, a inclusão de letras minúsculas denota uma posição, não um aminoácido particular nessa posição.

[0096] A Figura 66 retrata constante de dissociação aparente (K_{Dapp}), taxa de associação (k_a) e taxa de dissociação (k_d) de variantes mAb C[PD-1]_H1L1 projetadas por afinidade combinando a variante VH de substituição única favorável e a variante VL de substituição única (no contexto de IL15/Rα-Fc direcionado a PD-1) como determinado por Octet. As substituições em regiões variáveis pesadas ou variáveis leves, quando listadas, são baseadas na numeração Xencor (com a posição Kabat correspondente listada na próxima coluna). H1.19_L1.1 permite maior afinidade do que H1.132_L1.1, apesar de H1.132_L1 fornecer maior afinidade do que H1.19_L1.

[0097] A Figura 67 retrata a constante de dissociação aparente (K_{Dapp}), taxa de associação (k_a) e taxa de dissociação (k_d) de variantes de mAb C[PD-1]_H1L1 projetadas por afinidade combinando múltiplas substituições no VH e/ou VL (no contexto de IL15/Rα-Fc direcionada a PD-1) como determinado por Octet. As substituições em regiões variáveis pesadas ou variáveis leves, quando listadas, são baseadas na numeração Xencor (com a posição Kabat correspondente listada na próxima coluna). A variante VL de substituição tripla N31H/K36Y/S99T (L1.140; N27dH/K30Y/S93T na numeração de Kabat) demonstra uma melhoria de 36 vezes em K_D em relação ao tipo selvagem e combina bem com variantes de VH para exercer uma

melhoria de aproximadamente 100 vezes em K_D sobre o tipo selvagem.

[0098] As Figuras 68A a 68H retratam sequências de proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 ilustrativas do formato "scIL-15/Rα x Fab" que compreendem braço direcionado a PD-1 com base em mAb C ABD otimizado por afinidade e várias variantes de potência de IL-15. As CDRs são sublinhadas. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que estão sublinhadas, mas também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. Os ligantes são duplamente sublinhados (embora, como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, dentre os quais alguns são retratados nas Figuras 8 e 9), e as barras (/) indicam o limite (ou limites) entre IL-15, IL-15Rα, ligantes, regiões variáveis e regiões constantes/Fc. Como será claro para os versados na técnica, cada uma das proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 descritas também pode excluir ou incluir Xtend Fc (M428L/N434S).

[0099] As Figuras 69A a 69B retratam sequências de proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 ilustrativas do formato "scIL-15/Rα x Fab" que compreende braço direcionado a PD-1 com base em mAb C ABD otimizado por afinidade e várias variantes de potência de IL-15, adicionalmente compreendendo Xtend Fc (M428L/N434S). As CDRs são sublinhadas. Como observado no presente documento e como é verídico para cada sequência no presente documento que contém CDRs, a identificação exata das localizações CDR pode ser levemente diferente dependendo da numeração usada como é mostrado na Tabela 1 e, desse modo, no presente documento não são incluídas apenas as CDRs que estão sublinhadas, mas

também as CDRs incluídas dentro dos domínios VH e VL com o uso de outros sistemas de numeração. Os ligantes são duplamente sublinhados (embora, como será observado pelas pessoas versadas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, dentre os quais alguns são retratados nas Figuras 8 e 9), e as barras (/) indicam o limite (ou limites) entre IL-15, IL-15Rα, ligantes, regiões variáveis e regiões constantes/Fc.

[00100] A Figura 70 retrata a indução de A) células T $CD8^+$ e B) proliferação de células T $CD4^+$ por fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles) como indicado pela porcentagem de células em proliferação (determinado com base na diluição de CFSE). Os dados mostram que XENP30046 (tendo um braço direcionado a PD-1 com afinidade aumentada) induz a proliferação de células T $CD8^+$ e $CD4^+$ de forma mais potente do que XENP28543 (aumento de 2 vezes). Além disso, os dados mostram que a variante IL-15(D30N/N65D) não afeta drasticamente a atividade das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1.

[00101] A Figura 71 retrata a ativação de A) células T $CD8^+CD45RA^-$ e B) células T $CD8^+CD45RA^+$ após incubação com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles), como indicado pela porcentagem de células que expressam CD25.

[00102] A Figura 72 retrata a ativação de A) células T $CD4^+CD45RA^-$ e B) células T $CD4^+CD45RA^+$ após incubação com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles), como indicado pela porcentagem de células que expressam CD25.

[00103] A Figura 73 retrata a porcentagem de A) células T $CD4^+CD45RA^-$ e B) células T $CD4^+CD45RA^+$ que expressam PD-1 após incubação com fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade

de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles). Os dados mostram que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 induzem a regulação negativa de PD-1 em células $CD4^+$ e que a regulação negativa se correlaciona com a afinidade de PD-1.

[00104] A Figura 74 retrata a mudança no peso corporal (como uma porcentagem do peso corporal inicial) ao longo do tempo em camundongos NSG enxertados com huPBMC tratados com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles). 70% foi usado para ratos mortos.

[00105] A Figura 75 retrata o peso corporal nos dias A) 11, B) 14, C) 18 e D) 21 de camundongos NSG enxertados com huPBMC tratados com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com PD-1 variável afinidade e variantes de potência de IL-15 (e controles). 70% foi usado para ratos mortos. O valor p foi determinado usando o teste t não pareado. Os dados mostram que o tratamento com XENP30046 sozinho (tendo o braço direcionado a PD-1 com afinidade aprimorada) resultou em perda significativa de peso corporal como medido nos Dias 11 e 18 em comparação com o tratamento com PBS, enquanto o tratamento com XENP28543 sozinho não rendeu perda significativa de peso (em comparação ao tratamento com PBS).

[00106] As Figuras 76A a 76C retratam a concentração sérica de A) IFNγ, B) IL-10 e C) IL-2Rα em camundongos NSG enxertados com huPBMC nos dias 7, 11 e 14 após a dosagem com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles).

[00107] A Figura 77 retrata a ativação de A) células T $CD4^+$ e B) células T $CD8^+$ (como indicado por CD25 MFI) no Dia 7 no sangue de camundongos NSG enxertados com huPBMC doseados com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e

variantes de potência de IL-15 (e controles) (as estatísticas foram realizadas em dados transformados em log usando teste t não pareado).

[00108] A Figura 78 retrata A) célula $CD45^+$, B) célula T $CD3^+$, C) célula T $CD8^+$, D) célula T $CD4^+$ e E) contagens de células NK no Dia 11 no sangue de camundongos NSG enxertados com huPBMC doseados com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles) (as estatísticas foram realizadas em dados transformados em log usando teste t não pareado).

[00109] A Figura 79 retrata A) célula $CD45^+$, B) célula T $CD3^+$, C) célula T $CD8^+$, D) célula T $CD4^+$ e E) contagens de células NK no Dia 14 no sangue de camundongos NSG enxertados com huPBMC doseados com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles).

[00110] A Figura 80 retrata a indução de A) células T $CD8^+$ e B) proliferação de células T $CD4^+$ por fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles), como indicado pela porcentagem de células em proliferação (determinado com base na diluição de CFSE). Os dados mostram que XENP30272 (que tem um K_D de 3,1 nM para PD-1) é mais potente na indução da proliferação e ativação de várias populações de células T do que XENP30046 (que tem um K_D de 5,4 nM para PD-1). Notavelmente, enquanto XENP30429 (fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 com variante IL-15(D30N/E64Q/N65D)) foi apenas 1,8 a 2,5 menos ativo em células T $CD8^+$ e $CD4^+$ em comparação com XENP30046 (fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 tendo a variante IL-15(N4D/N65D)), XENP30432 (IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV substituto tendo a variante IL-15(D30N/E64Q/N65D)) foi 12 vezes menos ativo em células T $CD8^+$ e 530 vezes menos ativo em células T $CD4^+$ em comparação com XENP30046 (com base na atividade proliferativa). Isto sugere que as fusões de IL-15/Rα-Fc

direcionadas a PD-1 com a variante IL-15(D30N/E64Q/N65D) devem reter a atividade no ambiente do tumor, enquanto permanecem substancialmente inativas fora do ambiente do tumor.

[00111] A Figura 81 retrata a ativação de A) células T $CD4^+CD45RA^-$ e B) células T $CD4^+CD45RA^+$ após incubação com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles) como indicado por CD25 MFI.

[00112] A Figura 82 retrata a ativação de A) células T $CD8^+CD45RA^-$ e B) células T $CD8^+CD45RA^+$ após incubação com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com afinidade de PD-1 variável e variantes de potência de IL-15 (e controles) como indicado por CD25 MFI.

[00113] A Figura 83 retrata a expressão de PD-1 em A) células T $CD4^+$, B) células T $CD4^+CD45RA^-$ e C) células T $CD4^+CD45RA^+$ após incubação com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com variantes de afinidade de PD-1 e potência de IL-15 (e controles) variáveis, como indicado por PD-1 MFI.

[00114] A Figura 84 retrata a expressão de PD-1 em A) células T $CD8^+$, B) células T $CD8^+CD45RA^-$ e C) células T $CD8^+CD45RA^+$ após incubação com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com variantes de afinidade de PD-1 e potência de IL-15 (e controles) variáveis, como indicado por PD-1 MFI.

[00115] A Figura 85 retrata a expansão de A) células CD45, B) células T $CD3^+$, C) células T $CD4^+$ e D) células T $CD8^+$ em camundongos NSG (como indicado por contagens de células) no Dia 10 após a primeira dose com os artigos de teste indicados. Os dados mostram que a IL-15 de maior potência resulta em maior expansão de várias populações de linfócitos.

[00116] A Figura 86 retrata a ativação de A) células T $CD4^+$ e B) células T $CD8^+$ em camundongos NSG (como indicado pela coloração de CD25) no Dia 10 após a primeira dose com os artigos de teste indicados. Os

dados mostram que a IL-15 de maior potência resulta em maior expansão de várias populações de linfócitos.

[00117] As Figuras 87A a 87C retratam a indução de A) proliferação de células T $CD4^+$, B) células T $CD8^+$ e C) proliferação de células NK por fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 e fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a RSV de controle tendo Xtend Fc como indicado pela porcentagem de células em proliferação (determinado com base na diluição de CFSE). Notavelmente, os dados mostram que o EC50 para XENP30046 é comparável ao EC50 para XENP30290 (o Xtend análogo ao XENP30046).

[00118] A Figura 88 retrata a ativação de A) células T $CD4^+$ e B) células T $CD8^+$ por fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 e fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a RSV tendo Xtend Fc como indicado por CD25 MFI.

[00119] A Figura 89 retrata a regulação de PD-1 em A) células T $CD4^+$ e B) células T $CD8^+$ por fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 e fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a RSV tendo Xtend Fc como indicado por PD-1 MFI. Consistente com o Exemplo 9B, os artigos de teste regularam negativamente PD-1 em células T.

[00120] A Figura 90 retrata o volume do tumor (como determinado por medições de calibrador) ao longo do tempo em camundongos NSG enxertados com pp65-MCF7 e huPBMC doseados com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1, sozinhas ou em combinação com bloqueio de PD-1.

[00121] As Figuras 91A a 91H retrata o volume do tumor (como determinado por medições de calibrador) nos dias 11, 14, 17, 19, 21, 24, 26 e 28 (após enxerto de PBMC e primeira dose de artigos de teste) em camundongos NSG enxertados com pp65-MCF7 e huPBMC doseados com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1, sozinhas ou em combinação com bloqueio de PD-1. As estatísticas foram realizadas em dados corrigidos

de linha de base usando o teste de Mann-Whitney. * indica que o tratamento aumentou significativamente (p <0,05) a expansão em comparação com o controle de PBS. # indica que o tratamento aumentou significativamente (p <0,05) a expansão em comparação ao tratamento com XENP31123. † indica que o tratamento aumentou significativamente (p <0,05) a expansão em comparação com o bloqueio de PD-1 (XENP16432) sozinho. Os dados mostram que no Dia 28, todas as combinações de XENP30290 (0,1, 0,3 ou 1 mg/kg) ou XENP30516 (0,3, 1 ou 3 mg/kg) com bloqueio de PD-1 efetuado reduziu significativamente o tamanho do tumor em relação ao tratamento com PD-1 bloqueio sozinho.

[00122] As Figuras 92A a 92F retratam o número de células humanas A) $CD45^+$, B) células T $CD3^+$, C) células NK, D) células T $CD4^+$ e E) células T $CD8^+$, bem como F) razão entre células T CD8 e CD4 no sangue de camundongos NSG enxertados com pp65-MCF7 e huPBMC no Dia 14 após a primeira dose com os artigos de teste indicados. Estatísticas para expansão de células $CD45^+$ realizadas em dados transformados em log usando teste t não pareado. † indica que o tratamento aumentou significativamente a expansão em comparação com o bloqueio de PD-1 (XENP16432) sozinho.

[00123] As Figuras 93A a 93F retratam o número de células humanas A) $CD45^+$, B) células T $CD3^+$, C) células NK, D) células T $CD4^+$ e E) células T $CD8^+$, bem como F) razão entre células T CD8 e CD4 no sangue de camundongos NSG enxertados com pp65-MCF7 e huPBMC no Dia 21 após a primeira dose com os artigos de teste indicados. † indica que o tratamento aumentou significativamente a expansão em comparação com o bloqueio de PD-1 (XENP16432) sozinho.

[00124] A Figura 94 retrata o nível de expressão de PD-1 (como indicado por MFI) em várias populações de linfócitos em camundongos Hu-NSG com $CD34^+$ (antes do tratamento com quaisquer artigos de teste). Os dados mostram que os camundongos têm um perfil de expressão de PD-1

semelhante ao dos seres humanos, ou seja, maior expressão em populações de memória efetora.

[00125] A Figura 95 retrata o aumento de dobra em várias populações de linfócitos em camundongos Hu-NSG com $CD34^+$ no Dia 7 após tratamento com 0,3 mg/kg de XENP30046 ([IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 que compreende mAb C_H1_L1.1 e a variante IL-15(N4D/N65D)). O XENP30046 mostra uma expansão de mais de 100 vezes nas populações de memória efetora.

[00126] A Figura 96 retrata o aumento de dobra em várias populações de linfócitos em camundongos Hu-NSG com $CD34^+$ no Dia 7 após o tratamento com 0,3 mg/kg de XENP30429 (IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 que compreende mAb C_H1_L1.1 e a variante IL-15(D30N/E64Q/N65D)).

[00127] A Figura 97 retrata o aumento de dobra em várias populações de linfócitos em camundongos Hu-NSG com $CD34^+$ no Dia 7 após o tratamento com 0,3 mg/kg de XENP26007 (IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV de controle que compreende a variante IL-15(N4D/N65D)). XENP26007 mostra expansão muito baixa das várias populações de linfócitos, indicando que as fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 teriam expansão mínima de linfócitos periféricos.

[00128] A Figura 98 retrata o aumento de dobra em várias populações de linfócitos em camundongos Hu-NSG com $CD34^+$ no Dia 7 após o tratamento com 0,3 mg/kg de XENP30432 (IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV de controle que compreende variante IL-15(D30N/E64Q/N65D)). XENP30432 mostra uma expansão muito baixa das várias populações de linfócitos que indicam que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 teriam expansão mínima de linfócitos periféricos.

[00129] A Figura 99 retrata a mudança em A) células CD45, B) células $CD3^+$, C) células $CD4^+$, D) células $CD8^+$, E) células γδ e F) células NK em

camundongos Hu-NSG com $CD34^+$ ao longo do tempo após o tratamento com 0,3 mg/kg XENP30046, XENP30429, XENP26007 ou XENP30432.

[00130] A Figura 100 retrata a alteração em A) células virgens de CD4, B) células de memória central CD4, C) células efetoras terminais CD4 e D) células efetoras de memória CD4 em camundongos Hu-NSG com $CD34^+$ ao longo do tempo após tratamento com 0,3 mg/kg de XENP30046, XENP30429, XENP26007 ou XENP30432. Os dados mostram que XENP30046 e XENP30429 são seletivos para populações de $PD\text{-}1^+$, como células de memória CD4 efetoras. Notavelmente, a expansão de XENP30429 de células virgens de CD4 foi mínima, indicando que a redução da potência do braço de IL-15 melhora a seletividade.

[00131] A Figura 101 retrata a mudança em A) células virgens de CD8, B) células de memória central CD8, C) células efetoras terminais CD8 e D) células efetoras de memória CD8 em camundongos Hu-NSG com $CD34^+$ ao longo do tempo após tratamento com 0,3 mg/kg de XENP30046, XENP30429, XENP26007 ou XENP30432. Os dados mostram que XENP30046 e XENP30429 são seletivos para populações de $PD\text{-}1^+$, como células de memória CD8 efetoras. Notavelmente, a expansão de XENP30429 de células virgens de CD8 foi mínima, indicando que a redução da potência do braço de IL-15 melhora a seletividade.

[00132] As Figuras 102A a 102B retratam a correlação entre a expansão de linfócitos e a expressão de PD-1 de linha de base em camundongos Hu-NSG com $CD34^+$ no Dia 7 após o tratamento com A) 0,3 mg/kg de XENP30046 ou B) 0,3 mg/kg de XENP30429.

[00133] A Figura 103 retrata a expansão de A) células T $CD8^+$ e B) células NK em macacos cynomolgus doseados com 0,3X XENP22853, 1X XENP25937 ou 0,3X XENP24306. Os dados mostram que a fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 diminui a expansão das células NK enquanto mantém a expansão das células T $CD8^+$.

[00134] A Figura 104 retrata a expansão de A) células T virgens de $CD8^+$ e B) células T efetoras de memória $CD8^+$ em macacos cynomolgus doseados com 0,3X XENP22853, 1X XENP25937 ou 0,3X XENP24306. Os dados mostram que a fusão IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 expande seletivamente células T de memória efetoras $CD8^+$.

[00135] As Figuras 105A a 105E retratam a expansão de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) memória de células-tronco de CD8, C) virgens de CD8, D) células T γδ e E) células NK $CD56^+$ em macacos cynomolgus após administração com XENP30290 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15[N4D/N65D]) ou XENP30362 (αRSV x IL-15[N4D/N65D]). Coletivamente, os dados mostram que XENP30290 (tendo uma afinidade de PD-1 alta e potência de IL-15 mais alta) possibilitou farmacodinâmica periférica sustentada durante 2-3 semanas com a expansão de células $PD1^-$ modesta. Em particular, as células T γδ são a população de células com maior expansão de dobra; as células T virgens de $CD4^+$ e $CD8^+$ são a população de células com a menor expansão de dobra; e as células de memória das células-tronco $CD8^+$ são a população relevante de maior expansão.

[00136] As Figuras 106A a 106E retratam a expansão de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) memória de células-tronco CD8, C) CD8 virgem, D) células T γδ e E) células NK $CD56^+$ em macacos cynomolgus após administração com XENP30516 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15[D30N/E64Q/N65D]) ou XENP30518 (αRSV x IL-15[D30N/E64Q/N65D]). Coletivamente, os dados mostram que o XENP30516 (tendo alta afinidade para PD-1 e baixa potência de IL-15) permitiu farmacodinâmica periférica sustentada sem expansão significativa de células $PD1^-$. Em particular, as células T γδ são a população de células com maior expansão de dobra; as células T virgens de $CD4^+$ e $CD8^+$ são a população de células com a menor expansão de dobra; e as células de memória das células-tronco $CD8^+$ são a população relevante de maior expansão.

[00137] A Figura 107 retrata a mudança no nível de concentração sérica ao longo do tempo em macacos cynomolgus doseados com XENP30290, XENP30291, XENP29439 ou XENP30516. Os dados mostram que XENP30290, que tem a maior afinidade para PD-1 e maior potência de IL-15, resultou em eliminação mais rápida do que tanto XENP30291 quanto XENP29439, que têm menor afinidade para PD-1. No entanto, o XENP30516 que tem a afinidade de PD-1 mais alta, mas a potência de IL-15 mais baixa resultou em uma eliminação mais lenta do que o XENP30290.

[00138] A Figura 108 retrata a mudança no nível de concentração sérica ao longo do tempo em macacos cynomolgus doseados com XENP30290, XENP30292 ou XENP30516. Os dados mostram que o XENP30516 que tem a potência IL-15 mais baixa resultou em uma depuração mais lenta do que o XENP30290.

[00139] A Figura 109 retrata a mudança no nível de concentração sérica ao longo do tempo em macacos cynomolgus doseados com XENP30291 ou XENP30293.

[00140] A Figura 110 retrata a mudança no nível de concentração sérica ao longo do tempo em macacos cynomolgus doseados com XENP29439 ou XENP30302.

[00141] A Figura 111 retrata a mudança no nível de concentração sérica ao longo do tempo em macacos cynomolgus doseados com XENP30362 ou XENP30518. Os dados mostram que a maior potência da IL-15 se correlaciona com uma eliminação mais rápida.

[00142] As Figuras 112A a 112C retratam a mudança na expressão de PD-1 em várias populações de linfócitos ao longo do tempo em macacos cynomolgus doseados com A) XENP30290, B) XENP30516 ou C) XENP30362. Os dados mostram que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 aumentam a expressão de PD-1, enquanto a fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV não aumenta.

[00143] A Figura 113 retrata a correlação entre o pico de expansão de todos os subconjuntos de memória de células T e o pico de expressão de PD-1 induzida por XENP30290 ou XENP30516.

[00144] As Figuras 114A a 114E retratam a expansão de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) memória de células-tronco $CD8^+$, C) CD8 virgem ($PD1^{baixo}$), D) células γδ e E) células NK em macacos cinomolgos doseados com 1X dose baixa de XENP30290 (PD1x IL15[N4D/N65D]). Os dados mostram que o XENP30290 induziu a expansão das células $PD1^+$ em 1X dose baixa.

[00145] As Figuras 115A a 115E retratam a expansão de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) memória de células-tronco $CD8^+$, C) CD8 virgem ($PD1^{baixo}$), D) células γδ e E) células NK em macacos cinomolgos doseados com dose alta de 10X XENP30290 (PD1 x IL15[N4D/N65D]) e XENP30362 substituto direcionado a RSV como contraparte. Os dados mostram que XENP30290 induziu boa expansão de células $PD1^+$ em 10X alta dose, mas tem atividade moderada em células $PD1^-$ como mostrado pela atividade de XENP30362 de controle direcionado a RSV.

[00146] As Figuras 116A-116E retratam a expansão de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) memória de células-tronco $CD8^+$, C) CD8 virgem ($PD1^{baixo}$), D) células γδ e E) células NK em macacos cynomolgus doseados com 10X dose alta de XENP30516 (PD1 x IL15[D30N/E64Q/N65D]). Os dados mostram que XENP30516 induziu boa expansão de células $PD1^+$ em alta dose de 10X.

[00147] As Figuras 117A-117E retratam a expansão de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) memória de células-tronco $CD8^+$, C) CD8 virgem ($PD1^{baixo}$), D) células γδ e E) células NK em macacos cynomolgus doseados com 30X dose muito alta de XENP30516 (PD1 x IL15[D30N/E64Q/N65D]) e XENP30518 substituto direcionado a RSV como contraparte. Os dados mostram que o XENP30516 induziu uma maior expansão de $PD1^+$ a 30X dose muito alta, mantendo uma excelente seletividade.

[00148] A Figura 118 resume a expansão de células T $CD8^+PD1^+$ em macacos cynomolgus doseados com várias concentrações de várias fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 ou RSV que compreendem IL-15[N4D/N65D] ou IL-15[D30N/E64Q/N65D].

[00149] As Figuras 119A-119E retratam a correlação entre a razão de seletividade e a expansão de dobra de expansão de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) memória de células-tronco $CD8^+$, C) CD8 virgem ($PD1^{baixo}$), D) células γδ e E) células NK em macacos cynomolgus dosados com várias concentrações de várias fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 ou RSV que compreendem IL-15[N4D/N65D] ou IL-15[D30N/E64Q/N65D]. Coletivamente, os dados mostram que o aumento da dose resulta em maior seletividade.

[00150] A Figura 120 retrata as sequências de XENP20818 (IL-15 WT), XENP22821 (IL-15[N65D]) e XENP24045 (IL-15[D30N/E64Q/N65D]) que são proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc ilustrativas do formato "IL-15/Rα-heteroFc". IL-15 e IL-15Rα(sushi) estão sublinhadas, os ligantes são duplamente sublinhados (embora, como será apreciado pelos especialistas na técnica, os ligantes possam ser substituídos por outros ligantes, alguns dos quais estão retratados na Figura 7), e barras (/) indicam o limite (ou limites) entre as IL-15, IL-15Rα, ligantes e regiões Fc.

[00151] A Figura 121 retrata a proliferação de Tregs expandidos de rapamicina após tratamento com fusões XENP20818 e XENP24045 de IL-15/Rα-Fc não direcionadas, bem como várias fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 ou RSV de controle. Os dados mostram que as fusões IL-15/Rα-Fc (direcionadas e não direcionadas) induzem a proliferação das Tregs expandidas com rapamicina (como medido pela diluição Tag-it Violet). Notavelmente, as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 foram muito menos potentes na indução da proliferação de Tregs em comparação com as fusões de IL-15/Rα-Fc não direcionadas.

[00152] As Figuras 122A a 112B retratam a proliferação de A) células T efetoras de memória CD8 e B) células T efetoras CD4 de memória (como determinado pela diluição CFSE) após incubação de 1 x 10^5 PBMCs marcadas com CFSE com 5 µg/ml dos artigos de teste indicados e número crescente de Tregs expandidos com rapamicina. Os dados mostram que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 mudaram (reduziram) a potência da supressão induzida por Treg de CD8 e proliferação de células T efetoras de memória CD4. Notavelmente, a mudança pelas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a RSV foi menor que a redução na potência induzida pelas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1.

[00153] As Figuras 123A a 123B retratam a razão A) entre Treg e células T efetoras de memória CD8 e B) entre Treg e células T efetoras de memória CD4 após incubação de 1 x 10^5 PBMCs marcadas com CFSE com 5 µg/ml dos artigos de teste indicados e aumentando número de Tregs expandidas com rapamicina. Os dados mostram que, em comparação com artigos sem teste, as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 aumentaram a razão Treg/T_{EM}, e ainda a proliferação de células T_{EM} é aumentada pelas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1. Isso indica que, embora Tregs sejam expandidas, as Tregs expandidas demonstram capacidade supressiva diminuída.

[00154] As Figuras 124A a 124B retratam a porcentagem de proliferação de A) células T $CD8^+$ e B) células T $CD4^+$ (como determinado pela diluição de CFSE) após a incubação de PBMCs estimuladas por CD3 com Tregs expandidas de rapamicina pré-cultivadas por 6 dias com meio de Treg completo (RPMI com FBS a 10%, 0,5 µg/ml de anti-CD28, 100 U/ml de IL-2, 100 ng/ml de rapamicina); meio de Treg completo sem rapamicina; ou com 100 ng/ml de IL-15 (em RPMI com FBS a 10%, 0,5 µg/ml de anti-CD28; sem IL-2; sem rapamicina). Os dados mostram que Tregs pré-tratadas com IL-15 apresentam capacidade supressora diminuída.

[00155] A Figura 125A a 125B descreve a expressão de CD25 e FOXP3 em células T $CD4^+$ em PBMCs tratadas A) sem ou B) com 5 µg/ml de fusão XENP22821 de IL-15/Rα-Fc por 14 dias. Os dados mostram que o tratamento com XENP22821 reduziu a expressão de FOXP3 na população de células T $CD4^+$.

[00156] As Figuras 126A a 126B retratam a expressão de CD45RA e FOXP3 em células T $CD4^+$ em PBMCs tratadas A) sem ou B) com 5 µg.ml de fusão XENP22821 de IL-15/Rα-Fc por 14 dias. Os dados mostram que o tratamento com XENP22821 desloca as populações de $CD4^+CD45RA^-$ de $FoxP3^{alto}$ para $FoxP3^{baixo}$, indicando que o tratamento com fusões de IL-15/Rα-Fc realmente deslocou a população de eTreg (população diminuída de 5,24% para 2,72%) para células T CD4 efetoras ativadas (população aumentada de 18,2% para 28,6%).

[00157] As Figuras 127A a 127B retrata a expressão de CD25 e CCR4 em células T $CD4^+$ em PBMCs tratadas A) sem ou B) com 5 µg/ml de fusão XENP22821 de IL-15/Rα-Fc por 14 dias. Os dados mostram que o tratamento com XENP22821 reduziu a expressão de CCR4 na população de células T $CD4^+$.

[00158] As Figuras 128A a 128B retratam a proliferação de A) células T CD8 e B) células T CD4 (como determinado pela diluição de CFSE) após a incubação de PBMCs marcadas com CFSE em 100 ng/ml de anti-CD3 (OKT3) em placa com 10 µg/ml de fusão XENP24045 de IL-15/Rα-Fc e concentração indicada de TGFß1. Os dados mostram que TGFß suprime a proliferação de células T de maneira dependente da dose; no entanto, notavelmente, a fusão de IL-15/Rα-Fc previne a supressão de TGFß da proliferação de células T em todas as doses testadas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. NOMENCLATURA

[00159] As proteínas de fusão heterodiméricas da invenção são listadas

em vários formatos diferentes. Cada polipeptídeo recebe um número "XENP" exclusivo, apesar, como será apreciado na técnica, de uma sequência mais longa poder conter uma mais curta. Por exemplo, a cadeia pesada de um monômero que compreende o Fab para anti-PD-1 (consultar a Figura 28C, por exemplo) terá um primeiro número XENP, enquanto os domínios VH e VL podem ter um número XENP diferente. Algumas moléculas têm três polipeptídeos, então o número XENP, com os componentes, é usado como um nome. Assim, a molécula XENP29484, que está em "scIL-15/Rα X Fab" compreende três sequências, geralmente ditas como "cadeia 1 XENP29484", "cadeia 2 XENP29484" e "cadeia 3 XENP29484" ou equivalentes, embora um indivíduo versado na técnica seria capaz de identificá-las facilmente por meio do alinhamento de sequência. Esses números XENP estão na lista de sequência, bem como identificadores, e são usados nas Figuras. Além disso, uma molécula, que compreende os três componentes, dá origem a vários identificadores de sequência. Por exemplo, a listagem do monômero Fab tem a sequência de comprimento total, a sequência pesada variável e as três CDRs da sequência pesada variável; a cadeia leve tem uma sequência de comprimento total, uma sequência leve variável e as três CDRs da sequência leve variável; e o domínio scFv-Fc tem uma sequência de comprimento total, uma sequência scFv, uma sequência leve variável, 3 CDRs leves, um ligante scFv, uma sequência pesada variável e 3 CDRs pesadas; observe que todas as moléculas no presente documento com um domínio scFv usam um único ligante scFv carregado (+H), embora outros possam ser usados. Além disso, a nomenclatura de nomes de domínios variáveis específicos usa um tipo de formato "Hx.xx_Ly.yy", com os números sendo identificadores exclusivos para sequências de cadeia variável específicas. Assim, o domínio variável do lado Fab de XENP30486 (que se liga a PD-1) é "H1.132", o que indica que o domínio pesado variável H1.132 foi usado, e em XENP30486, foi combinado com o domínio leve L1.135 Assim, a designação "mAbC[PD-1]_

H1.132_L1.135" indica que o domínio variável pesado H1.132 foi combinado com o domínio leve L1.135. No caso em que essas sequências são combinadas em um scFv, essa designação mostra que o scFv está na orientação VH-ligante-VL, do terminal N para o terminal C. Essa molécula com as sequências idênticas dos domínios variáveis pesados e leves, mas na ordem inversa, seria denominada "mAbC[PD-1]_ L1.135_H1.132". Da mesma forma, diferentes construtos podem "misturar e combinar" as cadeias pesadas e leves, como será evidente a partir da listagem de sequências e das Figuras.

II. DEFINIÇÕES

[00160] De modo que o pedido possa ser compreendido mais completamente, várias definições são apresentadas abaixo. Tais definições devem englobar equivalentes gramaticais.

[00161] Por "ablação", entende-se, no presente documento, uma diminuição ou remoção de atividade. Desse modo, por exemplo, "ligação de FcγR de ablação" significa que a variante de aminoácido da região Fc tem menos de 50% de ligação inicial em comparação a uma região Fc que não contém a variante específica, com mais de 70-80-90-95-98% de perda de atividade sendo preferencial, e, em geral, com a atividade abaixo do nível de ligação detectável em um ensaio Biacore. De uso particular na ablação da ligação de FcγR são aqueles mostrados na Figura 6. No entanto, a menos que indicado de outra forma, os monômeros Fc da invenção retêm a ligação ao receptor FcRn.

[00162] Por "ADCC" ou "citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo", como usado no presente documento, entende-se a reação mediada por células, em que as células citotóxicas não específicas que expressam FcγRs reconhecem o anticorpo ligado em uma célula-alvo e subsequentemente provocam a lise da célula-alvo. A ADCC está correlacionada à ligação a FcγRIIIa; ligação aumentada a FcγRIIIa resulta em

um aumento na atividade de ADCC. Como abordado no presente documento, diversas modalidades da invenção ablacionam a atividade ADCC inteiramente.

[00163] Por "ADCP" ou fagocitóse mediada por célula dependente de anticorpo, como usado no presente documento, entende-se a reação mediada por célula em que as células citotóxicas não específicas que expressam FcγRs reconhecem o anticorpo ligado em uma célula-alvo e, subsequentemente, causam fagocitose da célula-alvo.

[00164] Por "domínio de ligação a antígeno" ou "ABD", no presente documento, entende-se um conjunto de seis Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs - "Complementary Determining Regions") que, quando presentes como parte de uma sequência de polipeptídeos, se ligam especificamente a um antígeno alvo, como discutido no presente documento. Assim, um "domínio de ligação ao antígeno PD-1" se liga a um antígeno PD-1 humano como descrito neste documento (e em muitos casos também se ligará a PD-1 de macaco cinomolo). Como conhecido na técnica, essas CDRs estão geralmente presentes como um primeiro conjunto de CDRs pesadas variáveis (vhCDRs ou V_HCDRs) e um segundo conjunto de CDRs leves variáveis (vlCDRs ou V_LCDRs), sendo que cada um compreende três CDRs: vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3 para a cadeia pesada e vlCDR1, vlCDR2 e vlCDR3 para a cadeia lave. As CDRs estão presentes nos domínios leve variável e pesado variável, respectivamente, e juntos formam uma região Fv. Desse modo, em alguns casos, as seis CDRs do domínio de ligação a antígeno são contribuídas por uma cadeia pesada variável e leve variável. Em um formato "Fab", o conjunto de 6 CDRs são contribuídos por duas diferentes sequências polipeptídicas, o domínio pesado variável (vh ou V_H; que contém o vhCDR1, vhCDR2 e vhCDR3) e o domínio leve variável (vl ou V_L; que contêm a vlCDR1, vlCDR2 e vlCDR3), em que o terminal C do domínio de vh é fixado ao terminal N do domínio CH1 da cadeia pesada e o terminal C do

domínio vl é fixado ao terminal N do domínio leve constante (e, desse modo, formando a cadeia leve). Em um formato scFv, os domínios vh e vl são covalentemente fixados, de modo geral através do uso de um ligante como delineado no presente documento, em uma única sequência de polipeptídeos, que pode ser ou (começando do terminal N) vh-ligante-vl ou vl-ligante-vh.

[00165] A região hipervariável abrange geralmente resíduos de aminoácido de cerca de resíduos de aminoácido 24-34 (LCDR1; "L" representa cadeia leve), 50-56 (LCDR2) e 89-97 (LCDR3) na região variável de cadeia leve e em torno de cerca de 31-35B (HCDR1; "H" representa cadeia pesada), 50 a 65 (HCDR2), e 95-102 (HCDR3) na região variável de cadeia pesada; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) e/ou aqueles resíduos que formam uma alça hipervariável (por exemplo, resíduos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) e 91-96 (LCDR3) na região variável de cadeia leve e 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) e 96-101 (HCDR3) na região variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. As CDRs específicas da invenção são descritas abaixo.

[00166] Como será observado pelos indivíduos na técnica, a numeração exata e a colocação das CDRs podem ser diferentes dentre diferentes sistemas de numeração. No entanto, deve-se entender que a divulgação de uma sequência variável leve e/ou uma variável pesada inclui a divulgação das CDRs associadas (inerentes). Consequentemente, a divulgação de cada região pesada variável é uma divulgação das vhCDRs (por exemplo, vhCDR1, vhCDR2 e vhCDR3) e a divulgação de cada região leve variável é uma divulgação das vlCDRs (por exemplo, vlCDR1, vlCDR2 e vlCDR3).

[00167] Uma comparação útil da numeração de CDR é como abaixo, consulte Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27(1): 55 a 77 (2003):

TABELA 1

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact	Xencor
vhCDR1	26 a 35	27 a 38	31 a 35	26 a 35	26 a 32	30 a 35	27 a 35
vhCDR2	50 a 65	56 a 65	50 a 65	50 a 58	52 a 56	47 a 58	54 a 61
vhCDR3	95 a 102	105 a 117	95 a 102	95 a 102	95 a 102	93 a 101	103 a 116
vlCDR1	24 a 34	27 a 38	24 a 34	24 a 34	24 a 34	30 a 36	27 a 38
vlCDR2	50 a 56	56 a 65	50 a 56	50 a 56	50 a 56	46 a 55	56 a 62
vlCDR3	89 a 97	105 a 117	89 a 97	89 a 97	89 a 97	89 a 96	97 a 105

[00168] Ao longo do presente relatório descritivo, o sistema de numeração Kabat é geralmente usado quando se refere a um resíduo no domínio variável (aproximadamente, os resíduos 1 a 107 da região variável de cadeia leve e resíduos 1 a 113 da região variável de cadeia pesada) e o sistema de numeração EU para regiões Fc (por exemplo, Kabat et al., supra (1991)).

[00169] A presente invenção fornece um grande número de diferentes conjuntos de CDR. Nesse caso, um conjunto de "CDRs completas" compreendem as três CDRs pesadas variáveis e as três CDRs leves variáveis, por exemplo, um vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 e vhCDR3. As mesmas podem ser parte de um domínio pesado variável ou leve variável, respectivamente. Além disso, como delineado mais completamente no presente documento, os domínios leve variável e pesado variável podem estar em cadeias polipeptídicas separadas, quando uma cadeia pesada e leve é usada (por exemplo, quando os Fabs são usados), ou em um única cadeia polipeptídica no caso se sequências scFv.

[00170] As CDRs contribuem para a formação da ligação antígeno, ou mais especificamente, sítio de ligação a epítopo dos anticorpos. "Epítopo" se refere a um determinante que interage com um sítio de ligação a antígeno específico na região variável de um anticorpo molécula conhecido como um paratopo. Os epítopos são agrupamentos de moléculas, como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e, normalmente, têm características estruturais específicas, assim como características de carga específicas. Um único antígeno pode ser mais que um epítopo.

[00171] O epítopo pode compreende resíduos de aminoácido envolvidos diretamente na ligação (também denominado de componente

imunodominante do epítopo) e outros resíduos de aminoácido, que não estão envolvidos diretamente na ligação, como resíduos de aminoácido que são bloqueados com eficácia pelo peptídeo de ligação a antígeno específico; em outras palavras, o resíduo de aminoácido está dentro da marcação do peptídeo de ligação a antígeno específico.

[00172] Os epítopos podem ser ou conformacionais ou lineares. Um epítopo conformacional é produzido por aminoácidos justapostos espacialmente de diferentes segmentos da cadeia polipeptídica linear. Um epítopo linear é um produzido por resíduos de aminoácido adjacentes e um uma cadeia polipeptídica. Os epítopos conformacionais e não conformacionais podem ser distinguidos pelo fato de que a ligação ao primeiro, porém, não ao último, é perdida na presença de solventes de desnaturação.

[00173] Um epítopo inclui tipicamente pelo menos 3 e mais comumente pelo menos 5 ou 8 a 10 aminoácidos em uma conformação espacial exclusiva. Os anticorpos que reconhecem o mesmo epítopo podem ser verificados em um imunoensaio simples que mostra a capacidade de um anticorpo de bloquear a ligação de outro anticorpo a um antígeno-alvo, por exemplo “binning”. Como delineado abaixo, a invenção não apenas inclui os domínios de ligação enumerados a antígeno e anticorpos no presente documento, como também aqueles que competem pela ligação com os epítopos ligados pelos domínios de ligação a antígeno enumerados (ou, no caso do NC[PD-1] Fvs, as CDRs anti-PD-1 da presente invenção não competem pela ligação ao mesmo epítopo que os anticorpos enumerados.

[00174] Em termos de anticorpos, componentes dos quais são usados na presente invenção, a porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante principalmente responsável pela função efetora. Kabat et al. coletou inúmeras sequências primárias das regiões variáveis de cadeias pesadas e cadeias leves. Com base no grau de conservação das sequências, os

mesmos classificaram sequências primárias individuais na CDR e o framework e fizeram uma lista das mesmas (consulte SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª edição, publicação NIH, nº 91-3242, E.A. Kabat et al., incorporada a título de referência em sua totalidade).

[00175] Na subclasse de IgG de imunoglobulinas, há diversos domínios de imunoglobulina na cadeia pesada. Por "domínio de imunoglobulina (Ig)" entende-se, no presente documento, uma região de uma imunoglobulina que tem uma estrutura terciária distinta. De interesse na presente invenção há os domínios de cadeia pesada, incluindo os domínios pesados constantes (CH) e os domínios de dobradiça. No contexto dos anticorpos de IgG, os isotipos de IgG têm, cada um, três regiões CH. Consequentemente, os domínios "CH" no contexto da IgG são os seguintes: "CH1" se refere às posições 118 a 220 de acordo com o índice EU, como em Kabat. "CH2" se refere às posições 231 a 340 de acordo com o índice EU, como em Kabat, e "CH3" se refere às posições 341 a 447 de acordo com o índice EU como em Kabat. Como mostrado no presente documento e descrito abaixo, as variantes de pI podem estar em uma ou mais das regiões CH, assim como na região de dobradiça, discutida abaixo.

[00176] Outro tipo de domínio de Ig da cadeia pesada é a região de dobradiça. Por "dobradiça" ou "região de dobradiça" ou "região de dobradiça de imunoglobulina" ou "região de dobradiça de imunoglobulina" entende-se, no presente documento, o polipeptídeo flexível que compreende os aminoácidos entre o primeiro e segundo domínios constantes de um anticorpo. Estruturalmente, o domínio CH1 de IgG termina na posição EU 215 e o domínio CH2 de IgG começa na posição EU 231 de resíduo. Desse modo, para a IgG, a dobradiça de anticorpo é definida no presente documento com inclusiva das posições 216 (E216 em IgG1) a 230 (P230 em IgG1), sendo que a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat. Em algumas modalidades, por exemplo, no contexto de uma região Fc, a

dobradiça inferior é incluída, com "dobradiça inferior" que se refere geralmente à posição 226. Como notado no presente documento, as variantes de pI também podem ser feitas na região de dobradiça.

[00177] Como será observado pelos indivíduos na técnica, a numeração e a colocação exatas dos domínios de região constante pesada podem ser diferentes dentre diferentes sistemas de numeração. Uma comparação útil da numeração da região constante pesada de acordo com EU e Kabat é como abaixo, consultar Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85 e Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos, National Institutes of Health, Bethesda, inteiramente incorporado a título de referência.

TABELA 2

	Numeração EU	Numeração Kabat
CH1	118 a 215	114 a 223
Dobradiça	216 a 230	226 a 243
CH2	231 a 340	244 a 360
CH3	341 a 447	361 a 478

[00178] A cadeia leve compreende geralmente dois domínios, o domínio variável leve (que contém as CDRs de cadeia leve juntamente com os domínios pesados variáveis que formam a região Fv) e uma região de cadeia leve constante (muitas vezes denominada de CL ou Ck).

[00179] Outra região de interesse para substituições adicionais, delineada abaixo, é a região Fc.

[00180] Assim, a presente invenção fornece diferentes domínios de anticorpos. Como descrito no presente documento e conhecido na técnica, os anticorpos heterodiméricos da invenção compreendem diferentes domínios dentro das cadeias pesadas e leves, que podem estar em sobreposição também. Esses domínios incluem, porém sem limitação, o domínio de Fc, o domínio CH1, o domínio CH2, o domínio CH3, o domínio de dobradiça, o domínio constante pesado (CH1-dobradiça-domínio de Fc ou CH1-dobradiça-CH2-CH3), o domínio pesado variável, o domínio leve variável, o domínio constante leve, domínios Fab e domínios scFv.

[00181] Por “Fc” ou “região Fc” ou “domínio de Fc”, como usado no presente documento, entende-se o polipeptídeo que compreende a região constante de um anticorpo que exclui o primeiro domínio de imunoglobulina de região constante (por exemplo, CH1) e, em alguns casos, parte da dobradiça. Para IgG, o domínio Fc compreende os domínios de imunoglobulina CH2 e CH3 (Cγ2 e Cγ3) e a região de dobradiça entre CH1 (Cγ1) e CH2 (Cγ2). Embora os limites da região de Fc possam variar, a região de Fc de cadeia pesada de IgG humana é normalmente definida para incluir resíduos C226 ou P230 ao terminal carboxila da mesma, sendo que a numeração é de acordo com o índice EU, como em Kabat. Consequentemente, os domínios “CH” no contexto da IgG são os seguintes: “CH1” se refere às posições 118 a 215 de acordo com o índice EU, como em Kabat. “Dobradiça” se refere às posições 216 a 230 de acordo com o índice da UE como em Kabat. “CH2” se refere às posições 231 a 340 de acordo com o índice EU, como em Kabat, e “CH3” se refere às posições 341 a 447 de acordo com o índice EU como em Kabat. Assim, o “domínio Fc” inclui o domínio -CH2-CH3 e, opcionalmente, um domínio de dobradiça (dobradiça-CH2-CH3. Em algumas modalidades, como é descrito mais completamente abaixo, modificações de aminoácidos são realizadas na região Fc, por exemplo, a fim de alterar a ligação a um ou mais receptores FcγR ou ao receptor FcRn e para possibilitar a formação e purificação de heterodímero, como delineado no presente documento.

[00182] Assim, o “domínio Fc” inclui o domínio -CH2-CH3 e, opcionalmente, um domínio de dobradiça, o que, em muitos casos, serve como um ligante de domínio. Nas modalidades no presente documento, quando um scFv é fixado a um domínio de Fc, esse é o terminal C do construto de scFv que é fixado a toda a dobradiça do domínio de Fc ou parte da mesma; por exemplo, é fixado geralmente á sequência EPKS (SEQ ID NO: XX) que é o início da dobradiça. Da mesma forma, quando um componente

IL-15 (seja um complexo IL-15, um domínio IL-15 ou um domínio IL-15Rα) é anexado a um domínio Fc, o mesmo é geralmente anexado de forma semelhante a toda a dobradiça do Domínio Fc ou parte da mesma (como um ligante de domínio); por exemplo, o mesmo é geralmente anexado à sequência EPKS (SEQ ID NO: XX) que é o início da dobradiça.

[00183] A presente invenção se refere a anticorpos que geralmente se baseiam na classe IgG, que possuem várias subclasses, incluindo, porém sem limitação, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. De modo geral, IgG1, IgG2 e IgG4 são usadas com mais frequência que o IgG3. Deve-se verificar que a IgG1 tem alótipos diferentes com polimorfismos a 356 (D ou E) e 358 (L ou M). As sequências retratadas no presente documento utilizam o alótipo 356E/358M, no entanto, o outro alótipo está incluído no presente documento. Ou seja, qualquer sequência incluindo um domínio Fc de IgG1 incluída no presente documento pode ter 356D/358L substituindo o alótipo 356E/358M.

[00184] Além disso, muitas das sequências no presente documento têm pelo menos uma dentre as cisteínas na posição 220 substituídas por uma serina; geralmente, isso está no lado do "monômero scFv" ou no lado do "componente IL-15" para a maiorias das sequências retratadas no presente documento, embora também possa estar no lado de "monômero Fab", ou ambos, para reduzir a formação de dissulfeto. Especificamente incluídas dentro das sequências no presente documento estão uma ou ambas essas cisteínas substituídas (C220S).

[00185] Por "cadeia pesada" ou "domínio de cadeia pesada" se entende no presente documento, do terminal N ao C, os domínios VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3 (em que o CH2-CH3 compreende um domínio Fc). A cadeia pesada compreende um domínio pesado variável e um domínio constante, que inclui um domínio Fc de dobradiça opcional CH1 que compreende um CH2-CH3. A cadeia leve compreende uma cadeia leve variável e o domínio constante leve (VL-CL).

[00186] Por “modificação” entende-se no presente documento uma substituição, inserção e/ou deleção de aminoácidos em uma sequência polipeptídica ou uma alteração a uma porção química quimicamente ligada a uma proteína. Por exemplo, uma modificação pode ser uma estrutura de PEG ou de carboidrato alterada ligada a uma proteína. Por “modificação de aminoácidos” entende-se, no presente documento, uma substituição, inserção e/ou deleção de aminoácidos em uma sequência polipeptídica. Para maior clareza, a menos que observado de outra forma, a modificação de aminoácido é sempre em um aminoácido codificado pelo DNA, por exemplo, os 20 aminoácidos que têm códons no DNA e RNA.

[00187] Por “substituição de aminoácido” ou “substituição” entende-se, no presente documento, a troca de um aminoácido em uma posição particular em uma sequência polipeptídica parental por um aminoácido diferente. Em particular, em algumas modalidades, a substituição é de um aminoácido que não ocorre naturalmente na posição particular ou que não ocorre naturalmente dentro do organismo ou em qualquer organismo. Por exemplo, a substituição de E272Y ou 272Y se refere a um polipeptídeo variante, nesse caso, uma variante de Fc, em que o ácido glutâmico na posição 272 é substituído por tirosina. A título de clareza, a proteína que foi modificada para mudar a sequência de codificação de ácidos nucleicos, porém não muda o aminoácido inicial (por exemplo, trocar CGG (arginina de codificação) por CGA (ainda arginina de codificação) a fim de aumentar os níveis de expressão no organismo hospedeiro) não é uma “substituição de aminoácido”; ou seja, apesar da criação de um novo gene que codifica a mesma proteína, caso a proteína tenha o mesmo aminoácido na posição particular com o qual a mesma foi iniciada, não é uma substituição de aminoácidos.

[00188] Por “inserção de aminoácidos” ou “inserção”, como usado no presente documento, entende-se a adição de uma sequência de aminoácidos a

uma posição particular em uma sequência polipeptídica parental. Por exemplo, -233E designa uma inserção de ácido glutâmico após a posição 233 e antes da posição 234. Adicionalmente, -233ADE ou A233ADE indicam uma inserção de AlaAspGlu após a posição 233 e antes da posição 234.

[00189] Por "deleção de aminoácidos" ou "deleção", como usado no presente documento, entende-se a remoção de uma sequência de aminoácidos em uma posição particular em uma sequência polipeptídica progenitora. Por exemplo, E233-, E233#, E233(), E233_ ou E233del designam uma deleção do ácido glutâmico na posição 233. Além disso, EDA233- ou EDA233# indicam uma deleção da sequência GluAspAla que tem início na posição 233.

[00190] Por "proteína variante" ou "variante de proteína", ou "variante", como usado no presente documento, entende-se uma proteína que é diferente da proteína parental devido a pelo menos uma modificação de aminoácido. A variante de proteína pode se referir à própria proteína, uma composição que compreende a proteína ou a sequência amino que codifica a mesma. De preferência, a variante de proteína tem pelo menos uma modificação de aminoácido em comparação com uma proteína progenitora, por exemplo, de cerca de uma a cerca de setenta modificações de aminoácidos e, de preferência, de cerca de uma a cerca de cinco modificações de aminoácidos em comparação com a progenitora. Como descrito abaixo, em algumas modalidades, o polipeptídeo parental, por exemplo, um polipeptídeo parental Fc, é uma sequência do tipo selvagem humana, tal como a região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. A sequência de variante de proteína terá, no presente documento, preferencialmente, pelo menos cerca de 80% de identidade com uma sequência de proteínas parentais e, com máxima preferência, pelo menos cerca de 90% de identidade, com mais preferência pelo menos cerca de 95 a 98 a 99% de identidade. A proteína variante pode se referir à própria proteína variante, a composições que compreendem a variante de proteína ou à sequência de DNA que codifica a mesma.

[00191] Consequentemente, “variante de Fc” ou “variante de Fc”, como usado no presente documento, significa uma proteína que compreende uma modificação de aminoácido em um domínio Fc. As variantes de Fc da presente invenção são definidas de acordo com as modificações de aminoácidos que compõem as mesmas. Assim, por exemplo, N434S ou 434S é uma variante de Fc com a serina de substituição na posição 434 em relação ao polipeptídeo Fc progenitor, em que a numeração está de acordo com o índice EU. Do mesmo modo, M428L/N434S define uma variante de Fc com as substituições M428L e N434S em relação ao polipeptídeo Fc progenitor. A identidade do aminoácido WT pode não ser especificada, nesse caso a variante mencionada acima é denominada 428L/434S. Nota-se que a ordem na qual as substituições são fornecidas é arbitrária, ou seja, por exemplo, M428L/N434S é a mesma variante de Fc que N434S/M428L, e assim por diante. Para todas as posições abordadas na presente invenção que se referem a anticorpos, a menos que seja observado de outra forma, a numeração da posição dos aminoácidos está de acordo com o índice EU. O índice EU ou índice EU, como em Kabat ou esquema de numeração EU, se refere à numeração do anticorpo EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci EUA 63:78-85, incorporado a título de referência ao presente documento). A modificação pode ser uma adição, deleção ou substituição. As substituições podem incluir aminoácidos de ocorrência natural e, em alguns casos, aminoácidos sintéticos. Exemplos incluem a Patente nº US 6.586.207; os documentos WO 98/48032; WO 03/073238; US2004/0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9.026-9.027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11:1.135 -1.137; J. W. Chin, et al., (2002), PICAS United States of America 99:11.020-11.024; e L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10, incorporados a título de referência em sua totalidade.

[00192] Como usado no presente documento, “proteína” significa, no

presente documento, pelo menos dois aminoácidos covalentemente ligados, que incluem proteínas, polipeptídeos, oligopeptídeos e peptídeos. Por "resíduo", como usado no presente documento, entende-se uma posição em uma proteína e sua identidade de aminoácido associada. Por exemplo, Asparagina 297 (também denominada de Asn297 ou N297) é um resíduo na posição 297 no anticorpo humano IgG1.

[00193] Por "Fab" ou "região Fab", como usado no presente documento, entende-se o polipeptídeo que compreende os domínios de imunoglobulina VH, CH1, VL e CL. Fab pode se referir a essa região em isolamento, ou essa região no contexto de um anticorpo de comprimento completo, fragmento de anticorpo ou proteína de fusão Fab.

[00194] Por "Fv" ou "fragmento de Fv" ou "região de Fv", como usado no presente documento, entende-se um polipeptídeo que compreende os domínios V_L e V_H de um único anticorpo. Como será observado pelas pessoas versadas na técnica, as mesmas são, de modo geral, compostas de duas cadeias ou podem ser combinadas (geralmente com um ligante como discutido no presente documento) para formar um scFv.

[00195] Por "Fv de cadeia única" ou "scFv", no presente documento, entende-se um domínio pesado variável covalentemente fixado a um domínio leve variável, que usa geralmente um ligante scFv, como discutido no presente documento, para forma rum domínio de scFv ou scFv. Um domínio scFv pode estar em qualquer orientação do terminal N- a C (vh-ligante-vl ou vl-ligante-vh).

[00196] Por "modificação de subclasse de IgG" ou "modificação de isótipo", como usado no presente documento, entende-se modificação de aminoácidos que converte um aminoácido de um isótipo de IgG no aminoácido correspondente em um tipo de IgG alinhado diferente. Por exemplo, devido ao fato de que a IgG1 compreende uma tirosina e IgG2 uma fenilalanina na posição EU 296, uma substituição de F296Y em IgG2 é

considerada uma modificação de subclasse de IgG.

[00197] Desse modo, “isótipo”, como usado no presente documento, significa qualquer uma das subclasses de imunoglobulinas definidas pelas características antigênicas das regiões constantes das mesmas. Deve-se entender que os anticorpos terapêuticos também podem compreende híbridos de isótipos e/ou subclasses.

[00198] Por “região variável”, como usado no presente documento, entende-se a região de uma imunoglobulina que compreende um ou mais domínios de Ig codificados substancialmente por qualquer um dentre os genes Vκ, Vλ, e/ou VH que formam os loci kappa, lambda e genéticos de imunoglobulina de cadeia pesada respectivamente. Com referência aos domínios pesado e leve de variável da invenção, a porção amino-terminal de cada cadeia de anticorpo pesada ou leve inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos principalmente responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, geralmente denominada na técnica e no presente documento de “domínio Fv” ou “região Fv”. Na região variável, três alças são unidas para cada um dos domínios V de cadeia pesada e cadeia leve para formar um sítio de ligação a antígeno. Cada uma dessas alças é denominada de região de determinação de complementaridade (denominada doravante de “CDR”), na qual a variação nas sequências de aminoácidos é mais significativa. “Variável” se refere ao fato de que determinados segmentos da região variável são extensivamente diferentes na sequência dentre os anticorpos. Variabilidade dentro da região variável não é distribuída de maneira uniforme. Em vez disso, as regiões V consistem em estiramentos relativamente invariantes denominados de regiões estruturantes (FRs) de 15 a 30 aminoácidos separados por regiões mais curtas de “regiões hipervariáveis” de variabilidade extrema que têm, cada uma, 9 a 15 aminoácidos de comprimento ou mais.

[00199] Cada VH e VL é composto de CDRs e quatro regiões

estruturantes (FRs), dispostas a partir da terminação amino até a terminação carbóxi na seguinte ordem: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Assim, o domínio variável pesado compreende VHFR1-VHCDR1-VHFR2-VHCDR2-VHFR3-VHCDR3-VHFR4 e o domínio variável leve compreende VLFR1-VLCDR1-VLFR2-VLCDR2-VLFR3-VLCDR3-VLFR4.

[00200] Por “modificação de ocorrência não natural”, como usado no presente documento, entende-se uma modificação de aminoácido que não é isotípica. Por exemplo, devido ao fato de que nenhuma das IgGs compreende asparagina AN na posição 434, a substituição de 434S em IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 (ou híbridos das mesmas) é considerada uma modificação de ocorrência não natural.

[00201] Por “aminoácido” e “identidade de aminoácido”, como usado no presente documento, entende-se um dos 20 aminoácidos de ocorrência natural que são codificados por DNA e RNA.

[00202] Por “função efetora”, como usado no presente documento, entende-se um evento bioquímico que resulta da interação de uma região Fc de anticorpo com um receptor ou ligante Fc. As funções efetoras incluem, porém sem limitação, ADCC, ADCP e CDC.

[00203] Por “receptor gama Fc”, “FcγR” ou “FcgamaR”, como usado no presente documento, entende-se qualquer membro da família de proteínas que se ligam à região Fc do anticorpo IgG e que é codificado por um gene FcγR. Nos seres humanos, essa família inclui, porém sem limitação, FcγRI (CD64), incluindo as isoformas FcγRIa, FcγRIb, e FcγRIc; FcγRII (CD32), incluindo as isoformas FcγRIIa (incluindo alótipos H131 e R131), FcγRIIb (incluindo FcγRIIb-1 e FcγRIIb-2) e FcγRIIc; e FcγRIII (CD16), incluindo isoformas FcγRIIIa (incluindo alótipos V158 e F158) e FcγRIIIb (incluindo alótipos FcγRIIb-NA1 e FcγRIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65, incorporados a título de referência em sua totalidade), assim como quaisquer isoformas ou alótipos FcyRs ou FcyR humanos não constatados.

[00204] Por “FcRn” ou “Receptor Fc neonatal”, como usado no presente documento, entende-se uma proteína que se liga à região Fc do anticorpo IgG e é codificada, pelo menos em parte, por um gene FcRn. Como conhecido na técnica, a proteína FcRn funcional compreende dois polipeptídeos, frequentemente denominados cadeia pesada e cadeia leve. A cadeia leve é a beta-2-microglobulina e a cadeia pesada é codificada pelo gene FcRn. A menos que seja indicado de outra forma no presente documento, FcRn ou uma proteína FcRn se refere ao complexo da cadeia pesada de FcRn com beta-2-microglobulina. Uma variedade de variantes de FcRn pode ser usada para aumentar a ligação ao receptor FcRn e, em alguns casos, para aumentar a meia-vida no soro. Em geral, a menos que seja indicado de outra forma, os monômeros Fc da invenção retêm a ligação ao receptor FcRn (e, como dito abaixo, podem incluir variantes de aminoácidos para aumentar a ligação ao receptor FcRn).

[00205] Por “polipeptídeo parental”, como usado no presente documento, entende-se um polipeptídeo de partida que é subsequentemente modificado para gerar uma variante. O polipeptídeo parental pode ser um polipeptídeo de ocorrência natural, ou uma versão variante ou modificada de um polipeptídeo de ocorrência natural. O polipeptídeo progenitor pode se referir ao próprio polipeptídeo, às composições que compreendem o polipeptídeo progenitor ou à sequência de aminoácidos que codifica o mesmo.

[00206] Por “região constante pesada” entende-se, no presente documento, a porção CH1-dobradiça-CH2-CH3 de um anticorpo.

[00207] Por “proteína de fusão Fc” ou “imunoadesina” se entende uma proteína que compreende uma região Fc, geralmente ligada (opcionalmente através de uma porção química ligante, como descrito no presente documento) a uma proteína diferente, tal como a IL-15 e/ou IL-15Rα, como descrito no presente documento. Em alguns casos, duas proteínas de fusão Fc podem formar uma proteína de fusão Fc homodimérica ou uma proteína de

fusão Fc heterodimérica, sendo que a última é preferencial. Em alguns casos, um monômero da proteína de fusão Fc heterodimérica compreende um domínio de Fc sozinho (por exemplo, um domínio de Fc vazio) e o outro monômero é uma fusão Fc, que compreende um domínio de Fc variante e um domínio de proteína, tal como um complexo de IL-15. Como descrito neste documento, em algumas modalidades, um monômero da proteína heterodimérica é uma proteína de fusão Fc que compreende um complexo IL-15 e o outro monômero é uma cadeia pesada tradicional (com uma cadeia leve associada).

[00208] Por "posição", como usado no presente documento, entende-se uma localização na sequência de uma proteína. As posições podem ser numeradas sequencialmente ou de acordo com um formato estabelecido, por exemplo, o índice EU para numeração de anticorpo.

[00209] Por "qualidade de fita" no contexto dos monômeros dos anticorpos heterodiméricos da invenção no presente documento entende-se, semelhante às duas fitas de DNA que "correspondem", variantes de heterodimerização são incorporadas em cada monômero de modo a preservar a capacidade de "correspondente" para formar heterodímeros. Por exemplo, caso algumas variantes de pI sejam modificadas no monômero A (por exemplo, tornando o pI mais alto), então, as variantes estéricas que são "pares de carga" que podem ser utilizados não interferem com as variantes de pI, por exemplo, as variantes de carga que formam um pI superior são colocadas na mesma "fita" ou "monômero" para preservar ambas as funcionalidades. De modo semelhante, para variantes "enviesadas" que surgem em partes de um conjunto como delineado mais completamente abaixo, a pessoa versada na técnica considerará o pI na decisão na qual a fita ou monômero que incorpora um conjunto do par estará, de modo que a separação de pI seja maximizada com o uso do pI dos enviesamentos também.

[00210] Por "célula alvo", como utilizado no presente documento,

entende-se uma célula que expressa o antígeno alvo, neste caso, os receptores PD-1 e/ou IL-15.

[00211] Por "do tipo selvagem ou WT" entende-se, no presente documento, uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de nucleotídeos que é encontrada na natureza, incluindo variações alélicas. Uma proteína WT tem uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de nucleotídeos que não foi modificada intencionalmente.

[00212] As proteínas da presente invenção heterodiméricas bioespecíficas são geralmente isoladas ou recombinantes. "Isolado(a)", quando usado para descrever os vários polipeptídeos divulgados no presente documento, significa um polipeptídeo que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de uma célula ou cultura celular a partir da qual o mesmo foi expresso. Normalmente, um polipeptídeo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação. Uma "proteína isolada" se refere a uma proteína que é substancialmente livre de outras proteínas que têm diferentes especificidades de ligação. "Recombinante" significa que as proteínas são geradas com o uso de técnicas de ácido nucleico recombinantes em células hospedeiras exógenas.

[00213] "Percentagem (%) de identidade de sequências de aminoácidos" com relação a uma sequências de proteínas é definida como a porcentagem de resíduos de aminoácido em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácido na sequências específica (parental), após alinhar as sequências e introduzir lacunas, caso necessário, para alcançar a identidade de sequência de porcentagem máxima e sem considerar quaisquer substituições conservadoras como parte da identidade de sequência. Alinhamento para fins de determinação da porcentagem de identidade de sequência de aminoácidos pode ser obtido de várias maneiras que estão dentro da habilidade na técnica, por exemplo, com o uso do software de computador disponível publicamente, tal como o software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou

Megalign (DNASTAR). Aqueles versados na técnica podem determinar parâmetros apropriados para medir o alinhamento, que inclui quaisquer algoritmos necessários para alcançar o alinhamento máximo ao longo de todo o comprimento das sequências que são comparadas. Um programa particular é o programa ALIGN-2 descrito nos parágrafos [0279] a [0280] da Publicação nº U.S. 20160244525, incorporado no presente documento a título de referência.

[00214] O grau de identidade entre uma sequência de aminoácidos da presente invenção ("sequência da invenção") e a sequência de aminoácidos parentais é calculada como o número de correspondências exatas em um alinhamento das duas sequências, dividido pelo comprimento da "sequência da invenção" ou o comprimento da sequência parental, o que for mais curto. O resultado é expresso em porcentagem de identidade.

[00215] Em algumas modalidades, duas ou mais sequências de aminoácidos são pelo menos 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% idênticas. Em algumas modalidades, duas ou mais sequências de aminoácidos são pelo menos 95%, 97%, 98%, 99% ou mesmo 100% idênticas.

[00216] "Ligação específica" ou "se liga especificamente a" ou é "específica para" um antígeno ou um epítopo particular (nesse caso, PD-1 humano) significa ligação que é diferente de maneira mensurável de uma interação não específica. A ligação específica pode ser medida, por exemplo, determinando-se a ligação de uma molécula em comparação à ligação de uma molécula de controle, que geralmente é uma molécula de estrutura semelhante que não tem atividade de ligação. Por exemplo, a ligação específica pode ser determinada pela competição com uma molécula de controle que é semelhante ao alvo.

[00217] A ligação específica para um antígeno ou um epítopo particular pode ser exibida, por exemplo, por um ABD que tem uma K_D para um antígeno ou epítopo de pelo menos cerca de 10^{-4} M, pelo menos cerca de

10^{-5} M, pelo menos cerca de 10^{-6} M, pelo menos cerca de 10^{-7} M, pelo menos cerca de 10^{-8} M, pelo menos cerca de 10^{-9} M, alternativamente, pelo menos cerca de 10^{-10} M, pelo menos cerca de 10^{-11} M, pelo menos cerca de 10^{-12} M, ou maior, em que KD se refere a uma taxa de dissociação de uma interação particular entre antígeno e ABD. Tipicamente, um ABD que se liga especificamente a um antígeno terá uma KD que é 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 vezes superior ou mais para uma molécula de controle em relação ao antígeno ou epitopo.

[00218] Além disso, a ligação específica a um antígeno particular ou epítopo particular pode ser exibida, por exemplo, por um anticorpo que tem uma KA ou Ka para um antígeno ou epítopo pelo menos 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 vezes superior ou mais para o epítopo em relação a um controle, em que KA ou Ka se refere a uma taxa de associação de uma interação particular anticorpo-antígeno. A afinidade de ligação é geralmente medida usando um ensaio baseado em ressonância plasmônica de superfície (SPR) (por exemplo, Biacore) ou um ensaio baseado em interferometria de biocamada (BLI) (por exemplo, Octet).

III. INTRODUÇÃO

[00219] A invenção fornece proteínas de fusão heterodiméricas alvejadas que podem se ligar ao antígeno de PD-1 do inibidor de ponto de verificação e pode formar complexo com a cadeia gama comum (γc; CD132) e/ou com a cadeia β do receptor de IL-2 (IL-2Rβ; CD122) devido à presença de um complexo IL-15. De modo geral, as proteínas de fusão heterodiméricas da invenção têm três componentes funcionais: um componente IL-15/IL-15Rα(sushi), geralmente denominado no presente documento de “complexo IL-15” ou “complexo IL-15/Rα”, um componente anti-PD-1, que serve como uma porção química “direcionada” trazendo-se a proteína de fusão para uma célula que expressa PD-1, e um componente de Fc, dentre os quais cada um pode assumir diferentes formas e cada um pode ser combinado com os outros

componentes em qualquer configuração.

[00220] No entanto, o componente anti-PD-1 das proteínas de fusão heterodiméricas direcionadas da invenção não compete pela ligação com anticorpos anti-PD-1 conhecidos, como nivolumabe e pembrolizumabe. Ou seja, incluindo-se um domínio de ligação ao antígeno (ABD) anti-PD-1 (αPD-1) que não compete pela ligação com anticorpos αPD-1 aprovados ("NC [PD-1]"), as proteínas de fusão da invenção permitem terapias de combinação eficientes com terapias de anticorpos anti-PD-1. Ou seja, ao incluir um ABD anti-PD-1 que não compete pela ligação ("NC-αPD-1 ABD") com os tratamentos aprovados, o ABD não competitivo pode ser usado para direcionar as proteínas de fusão ao tumor, mas ainda permitem o tratamento terapêutico com um anticorpo anti-PD-1 adicional, uma vez que ambos podem se ligar de forma não competitiva a PD-1. Além disso, em algumas modalidades, os ABDs NC-αPD-1 também podem bloquear completamente a interação do PD-1:PD-L1 (modalidades com base nas variantes de mAb A), bloquear parcialmente a interação (variantes de mAbC) ou não bloquear em toda a interação (variantes mAbB).

[00221] Como será apreciado por aqueles na técnica e descrito neste documento, uma série de formatos diferentes para as diferentes proteínas de fusão heterodiméricas direcionadas, os construtos não concorrentes, "NC-αPD-1 X IL-15/Rα" são mostrados na Figura 28.

[00222] Além disso, a invenção se baseia em comparações das presentes modalidades com "proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc não direcionadas" que não contêm um domínio de ligação ao antígeno para um PD-1 humano, como retratado na Figura 13.

[00223] Além disso, as proteínas de fusão heterodiméricas não direcionadas ou direcionadas da invenção podem ser combinadas com outros anticorpos para receptores de ponto de verificação, incluindo anti-PD-1, anti-TIM-3, anti-LAG-3, anti-TIGIT, etc.

[00224] Consequentemente, a presente invenção fornece vários componentes funcionais diferentes que podem ser montados de várias maneiras diferentes para gerar as proteínas de fusão heterodiméricas da invenção. Como discutido acima, as proteínas de fusão incluem um complexo IL-15 que inclui um domínio IL-15 e um componente receptor de IL-15.

A. COMPLEXOS IL-15

[00225] Como mostrado nas Figuras, o complexo IL-15 pode assumir várias formas. Como afirmado acima, a proteína IL-15 sozinha é menos estável do que quando complexada com a proteína IL-15Rα. Como é conhecido na técnica, a proteína IL-15Rα contém um "domínio sushi", que é a região mais curta do receptor que retém a atividade de ligação da IL-15 e é SEQ ID NO: 4. Assim, embora as proteínas de fusão heterodiméricas que compreende todo o domínio extracelular da proteína IL-15Rα (SEQ ID NO: 3) ou fragmentos funcionais (por exemplo, maiores do que SEQ ID NO: 4, mas nem todas as SEQ ID NO: 3) possam ser feitas, modalidades preferenciais no presente documento incluem complexos que usam apenas o domínio sushi.

[00226] Consequentemente, os complexos de IL-15 compreendem geralmente a proteína IL-15 e o domínio sushi da IL-15Rα (a menos que seja indicado de outra forma que a sequência de comprimento total é usada, "IL-15Rα", "IL-15Rα(sushi)" e "sushi" são usados de forma intercambiável por todo o documento). Quando complexadas em conjunto, a nomenclatura é descrita com uma "barra", "/", como "IL-15/Rα", o que significa que há um domínio IL-15 e um domínio IL-15Rα presentes.

1. DOMÍNIOS IL-15

[00227] Como será apreciado por aqueles na técnica, o domínio IL-15 pode ser uma sequência humana de tipo selvagem ou pode ser modificado para incluir variantes, particularmente variantes de potência, como discutido abaixo.

[00228] Em algumas modalidades, a proteína IL-15 humana tem a sequência de aminoácidos apresentada na Seq. de Ref. NCBI Nº NP_000576.1 ou SEQ ID NO: 1, que é a sequência precursora. Em alguns casos, a sequência de codificação de IL-15 humana é apresentada na Seq. de Ref. NCBI nº NM_000585. Uma proteína IL-15 exemplificativa da proteína heterodimérica de fusão Fc delineada no presente documento pode ter a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (IL-15 madura), que corresponde aos aminoácidos 49 a 162 da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a proteína IL-15 tem pelo menos 90%, por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência com a SEQ ID NO.: 2.

[00229] Em algumas modalidades, o domínio IL-15 foi projetado para incluir substituições de aminoácidos.

[00230] Além disso, em algumas modalidades, a proteína humana IL-15 é projetada para conferir potência diminuída, como é geralmente descrito no documento PCT/US2019/028107, incorporado no presente documento a título de referência em sua totalidade. Isto é, como descrito no presente documento, a redução na potência de IL-15 nas proteínas de fusão heterodiméricas da invenção (opcionalmente com e sem substituições Xtend-Fc descritas no presente documento, como M428L/N434S) pode melhorar tanto a farmacodinâmica quanto a farmacocinética em indivíduos que são administrados tais proteínas. Da mesma forma, como mostrado no Exemplo 7 do documento PCT/US2019/028107, essas variantes de IL-15/Rα-Fc de potência reduzida, como XENP22821, podem expandir contagens de linfócitos por uma duração maior do que as proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc de tipo selvagem descritas no mesmo, como XENP20818. Notavelmente, XENP23343, o análogo de Xtend de XENP22821, aumentou ainda mais a duração da expansão de linfócitos além de XENP22821. Além disso, a redução da potência da IL-15 pode melhorar o índice terapêutico (ou seja,

permitir uma dosagem mais alta com menos toxicidade).

[00231] Como ilustrado no Exemplo 14, as proteínas de fusão de NC-αPD-1 X IL-15/Rα-Fc podem superar a supressão de Treg da proliferação de células T efetoras.

[00232] Da mesma forma, como mostrado no Exemplo 4, abaixo, as proteínas de fusão de NC-αPD-1 X IL-15/Rα-Fc podem promover a expansão de leucócitos e exacerbar a GVHD xenogênica em uma faixa de níveis de dose. Notavelmente, a terapia de combinação de proteínas de fusão de NC-αPD-1 X IL-15/Rα-Fc e um anticorpo anti-PD-1 mostrou sinergia (por exemplo, um efeito sinérgico), particularmente em uma dose baixa.

[00233] Como mostrado nos Exemplos 3 e 8, a proteína de fusão de ?PD-1 x IL-15/R?-Fc é seletiva para linfócitos ativados (por exemplo, aqueles que seriam encontrados no ambiente do tumor).

[00234] Consequentemente, a presente invenção fornece uma série de variantes de aminoácidos de IL-15 adequadas que conferem potência reduzida e farmacocinética aumentada, incluindo, porém sem limitação, proteínas IL-15 variantes que compreendem substituição (ou substituições) de aminoácidos selecionadas do grupo de N1D; N4D; D8N; D30N; D61N; E64Q; N65D; Q108E; N1D/N4D/D8N; N1D/N4D/N65D; N1D/D30N; N1D/D61N; N1D/D61N/E64Q/Q108E; N1D/E64Q; N1D/N65D; N1D/Q108E; N4D; N4D/D30N; N4D/D61N; N4D/D61N/N65D; N4D/D61N/E64Q/Q108E; N4D/E64Q; N4D/N65D; D8N/D61N; D8N/E64Q; D30N/E64Q; D30N/N65D; D30N/E64Q/N65D; D30N/Q180E; D61N/E64Q/N65D; E64Q; E64Q/N65D; E64Q/Q108E; e N65D/Q108E.

[00235] Em algumas modalidades, a substituição (ou substituições) de aminoácidos pode ser substituição isostérica na IL-15:IL-2β e IL-15:interface de cadeia gama comum.

[00236] Em algumas modalidades, a proteína IL-15 humana, tal como uma proteína IL-15 humana madura da proteína de fusão Fc é idêntica à

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em alguns casos, a proteína IL-15 humana, como a proteína IL-15 humana madura, não tem substituições de aminoácidos.

[00237] Em algumas modalidades, a proteína variante de IL-15 humana madura tem uma ou mais mutações de aminoácidos (por exemplo, substituições, inserções e/ou deleções). Em alguns casos, a mutação introduz um resíduo de cisteína que pode formar uma ligação dissulfeto com a proteína do receptor alfa da IL-15 humana (IL-15Rα).

[00238] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com a variante de aminoácido D30N. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e uma substituição D30N. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos uma substituição D30N.

[00239] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com a variante de aminoácido N1D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e uma substituição N1D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos uma substituição N1D.

[00240] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com a variante de aminoácido N4D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e uma substituição N4D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos uma substituição N4D.

[00241] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com a variante de aminoácido E64Q. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e uma substituição de E64Q. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos uma substituição E64Q.

[00242] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com a variante de aminoácido N65D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e uma substituição N65D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos uma substituição N65D.

[00243] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com substituições de aminoácidos N1D/D30N. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e substituições N1D/D30N. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos substituições N1D/D30N.

[00244] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com substituições de aminoácidos N4D/D30N. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e substituições N4D/D30N. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos substituições N4D/D30N.

[00245] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com substituições de aminoácidos D30N/E64Q. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e substituições D30N/E64Q. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos substituições D30N/E64Q.

[00246] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com substituições de

aminoácidos D30N/N65D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e substituições D30N/N65D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos substituições D30N/N65D.

[00247] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com substituições de aminoácidos N4D/N65D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 com substituições N4D/N65D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos substituições N4D/N65D.

[00248] Em algumas modalidades, a invenção fornece proteínas que compreendem uma variante de IL-15 humana com substituições de aminoácidos D30N/E64Q/N65D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 com substituições D30N/E64Q/N65D. Em algumas modalidades, a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e pelo menos substituições D30N/E64Q/N65D.

2. DOMÍNIOS IL-15/Rα

[00249] Além de um domínio IL-15, opcionalmente incluindo variantes de aminoácidos como descrito acima, as proteínas de fusão heterodiméricas da invenção incluem um domínio “sushi”.

[00250] Em algumas modalidades, a proteína IL-15 receptor alfa (IL-15Rα) humana tem a sequência de aminoácidos apresentada na Seq. de Ref. NCBI. nº NP_002180.1 ou SEQ ID NO.: 3. Em alguns casos, a sequência de codificação de IL-15Rα humana é apresentada na Seq. de Ref. NCBI nº NM_002189.3. Uma proteína IL-15Rα exemplificativa da proteína heterodimérica de fusão Fc delineada no presente documento pode compreende ou consistir no domínio sushi da SEQ ID NO.: 3 (por exemplo, aminoácidos 31 a 95 de SEQ ID NO.: 3), ou em outras palavras, a sequência

de aminoácidos de SEQ ID NO.: 4. Ou seja, modalidades particulares utilizam uma versão truncada do domínio extracelular do receptor.

[00251] Em algumas modalidades, a proteína IL-15Rα tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.: 4 e uma inserção de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em D96, P97, A98, D96/P97, D96/C97, D96/P97/A98, D96/P97/C98 e D96/C97/A98, em que a posição do aminoácido é relativa à proteína IL-15Rα humana de comprimento completo ou SEQ ID NO.: 3. Por exemplo, aminoácido (ou aminoácidos), tal como D (por exemplo, Asp), P (por exemplo, Pro), A (por exemplo, Ala), DP (por exemplo, Asp-Pro), DC (por exemplo, Asp-Cys), DPA (por exemplo, Asp-Pro-Ala), DPC (por exemplo, Asp-Pro-Cys), ou DCA (por exemplo, Asp-Cys-Ala) pode ser adicionado ao terminal C da proteína IL-15Rα de SEQ ID NO.: 4. Em algumas modalidades, a proteína IL-15Rα tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.: 4 e uma ou mais substituições de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em K34C, A37C, G38C, S40C e L42C, em que a posição do aminoácido é relativa à SEQ ID NO.: 4. A proteína IL-15Rα (sushi) da SEQ ID NO: 4 pode ter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais mutações de aminoácido (por exemplo, substituições, inserções e/ou deleções).

3. COMPLEXOS IL-15 EM DIFERENTES FORMATOS

[00252] Consequentemente, os complexos de IL-15 geralmente compreendem a proteína IL-15 e o domínio sushi de IL-15Rα. Quando complexadas em conjunto, a nomenclatura é descrita com uma “barra”, “/”, como “IL-15/Rα”, o que significa que há um domínio IL-15 e um domínio IL-15Rα presentes.

[00253] Como está retratado na Figura 28, o complexo IL-15/Rα pode estar em dois formatos diferentes; uma associação não covalente ou um complexo covalente. Como mostrado nas Figuras 28B, 28D, 28 F e 28G, a proteína IL-15 e a IL-15Rα(sushi) não estão ligadas covalentemente, mas sim

são automontadas através de interações de ligante-ligante regulares. Como será mais completamente descrito no presente documento, pode ser o domínio IL-15 ou o domínio sushi que está covalentemente ligado ao domínio Fc (geralmente com o uso de um ligante de domínio opcional).

[00254] Alternativamente, o complexo IL-15/Rα é uma ligação covalente usando um ligante de domínio como geralmente mostrado nas Figuras 28A, 28C, 28E e 28H. Em cada um desses casos, a orientação terminal N ao C da IL-15 e da IL-15Rα pode ser trocada: isto é, na Figura 28A, a invenção também inclui o caso em que o domínio IL-15 está no terminal N, com o domínio IL-15Rα sendo anexado usando um ligante para o domínio Fc. Da mesma forma, na Figura 28C, a invenção também inclui o caso em que o domínio IL-15 está no terminal N, com o domínio IL-15Rα sendo anexado usando um ligante para o domínio Fc. Na Figura 28E, a invenção também inclui o caso em que o domínio IL-15 está no terminal C do domínio Fc (vinculado usando um ligante de domínio), com o domínio IL-15Rα sendo anexado usando um ligante para o domínio IL-15. Finalmente, a Figura 28H também pode incluir o caso em que o domínio IL-15 é terminal N para o domínio IL-15Rα.

B. DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO ANTI-PD-1 NÃO CONCORRENTES

[00255] O componente anti-PD-1 (por exemplo, o domínio de ligação ao antígeno anti-PD-1 (ABD)) da invenção é geralmente um conjunto de 6 CDRs incluídas dentro de um domínio variável pesado e um domínio variável leve que formam um domínio Fv que podem se ligar a PD-1 humano (cuja sequência é retratada na Figura 2), mas não competem com anticorpos anti-PD-1 comerciais, como pembroluzimabe e nivolimabe. Isso permite excelente direcionamento das proteínas de fusão heterodiméricas da invenção para tumores, permitindo assim a ação local dos complexos IL-15/Rα, mas também permitindo tratamentos de combinação com anticorpos anti-PD-1

eficazes, sem competir pelos mesmos epítopos de PD-1.

[00256] Os domínios de ligação ao antígeno NC-αPD-1 da invenção podem assumir dois formatos gerais, seja como um domínio scFv, como aqueles retratados nas Figuras 28A e 28B, ou como um domínio Fab, presente em dois polipeptídeos diferentes, como aqueles retratados nas Figuras 28C e 28D (ligação monovalente de PD-1) e nas Figuras 28E, 28F, 28G e 28H (ligação bivalente de PD-1), que são descritas mais detalhadamente abaixo.

[00257] Há um grande número de domínios VH e VL que são úteis nos construtos presentes, vários dos quais são mostrados nas figuras, incluindo especificamente na Figura 43, que inclui sequências VH e VL para domínios de ligação ao antígeno que não competem pela ligação com pembrolizumabe e nivolumabe. Deve-se notar que qualquer um dos domínios VH pode ser combinado com qualquer um dos domínios VL, com combinações particulares úteis abaixo.

1. DOMÍNIOS VH

[00258] Com particular respeito às variantes de mAbC, há também um conjunto de variantes de afinidade úteis do domínio VH, como mostrado na Figura 65. Nessas modalidades, as substituições de aminoácidos particularmente úteis no domínio VH, em comparação com mAbC_H1, incluem, porém sem limitação, F32L, S52aG, R97E, R97Y e R97W, que podem ser usados sozinhos ou em combinação. Em particular, as combinações VH que são especificamente úteis em algumas modalidades além das cinco variantes de aminoácidos individuais incluem, porém sem limitação, F32L/S52aG e F32L/S52aG/R97W.

[00259] Em alguns aspectos, o domínio VH do NC-PD-1 ABD é selecionado daqueles retratados na Figura 43.

[00260] Em alguns aspectos, o NC-PD-1 ABD é baseado no mAbC parental (H1_L1, sequências mostradas na Figura 43) e o domínio VH da variante mAbC é selecionado a partir do grupo que consiste em H1, H1.1,

H1.2, H1.3, etc., a H1.168 da Figura 43.

[00261] Em alguns aspectos, o NC-PD-1 ABD é baseado no mAbC parental (H1_L1, sequências mostradas na Figura 43) e o domínio VH da variante mAbC é selecionado a partir do grupo que consiste em H1.19, H1.48, H1.125, H1.130, H1.132, H1.169 e H1.175 da Figura 43.

2. DOMÍNIOS VL

[00262] Com particular respeito às variantes de mAbC, há também um conjunto de variantes de afinidade úteis do VL, como mostrado na Figura 65. Nessas modalidades, substituições de aminoácidos particularmente úteis no domínio VL, em comparação com mAbC_L1, incluem, porém sem limitação, N27dH, N27dS, K30Y, S93T e Y94W, que podem ser usados sozinhos ou em combinação.

[00263] Em alguns aspectos, o domínio VL da variante de mAbC é selecionado a partir do grupo que consiste em L1.1, L1.3, L1.45, L1.117, L1.135, L1.136 e L1.140.

3. COMBINAÇÕES VH E VL

[00264] Dentro das estruturas principais parentais, por exemplo, dentro das sequências mAbC, os domínios VL e VH podem ser intercambiáveis, como é geralmente retratado na Figura 63.

[00265] De uso particular em algumas modalidades são a combinação de um VH selecionado do grupo que consiste em H1, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1.6, H1.7, H1.8, H1.9, H1.10, etc. a H1.168 (inclusivos) e H1.175 e L1.140.

[00266] De uso particular em algumas modalidades é a combinação de um VH selecionado a partir do grupo que consiste em H1, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1.6, H1.7, H1.8, H1.9, H1.10, etc., a H1.168 (inclusivos) e H1.175 e L1.1.

[00267] Uma combinação particular é útil na presente invenção é mAb C H1.19_L1.140.

[00268] Uma combinação particular é útil na presente invenção é mAb C H1_L1.1.

[00269] De uso particular em algumas modalidades são as combinações de domínio VH e VL de H1.19_L1.140, H1_L1.1, H1.19_L1, H1.48_L1, H1.125_L1, H1.30_L1, H1.132_L1, H1_L1.1 H1_L1.3, H1_L1.45, H1_L1.117, H1_L1.129, H1.19_L1.1, H1.32_L1.1, H1.169_L1.1, H1.169_L1.1, H1.175_L1.1, H1.175_L1.1, H1_L1. 140, H1_L1.135, H1_L1.136, H1.132_L1.135, H1.132_L1.140, H1.175_L1.135 e H1.175_L1.140.

[00270] Combinações adicionais de domínios VH e VL de mAbC que encontram uso na presente invenção incluem, porém sem limitação, mAb A[PD-1]_H1 e mAb A[PD-1]_L1; mAb B[PD-1]_H1 e mAb B[PD-1]_L1; mAb C[PD-1]_H1 e mAb C[PD-1]_L1; mAb C[PD-1]_H1 e mAb C[PD-1]_L1.1; mAb C[PD-1]_H1 e mAb C[PD-1]_L1.3; mAb C[PD-1]_H1 e mAb C[PD-1]_L1.45; mAb C[PD-1]_H1 e mAb C[PD-1]_L1.117; mAb C[PD-1]_H1 e mAb C[PD-1]_L1.135; mAb C[PD-1]_H1 e mAb C[PD-1]_L1.140; mAb C[PD-1]_H1 e mAb C[PD-1]_L2; mAb C[PD-1]_H1.132 e mAb C[PD-1]_L1; mAb C[PD-1]_H1.132 e mAb C[PD-1]_L1.1; mAb C[PD-1]_H1.132 e mAb C[PD-1]_L1.3; mAb C[PD-1]_H1.132 e mAb C[PD-1]_L1.45; mAb C[PD-1]_H1.132 e mAb C[PD-1]_L1.117; mAb C[PD-1]_H1.132 e mAb C[PD-1]_L1.135; mAb C[PD-1]_H1.132 e mAb C[PD-1]_L1.140; mAb C[PD-1]_H1.132 e mAb C[PD-1]_L2; mAb C[PD-1]_H2 e mAb C[PD-1]_L1; mAb C[PD-1]_H2 e mAb C[PD-1]_L1.1; mAb C[PD-1]_H2 e mAb C[PD-1]_L1.3; mAb C[PD-1]_H2 e mAb C[PD-1]_L1.45; mAb C[PD-1]_H2 e mAb C[PD-1]_L1.117; mAb C[PD-1]_H2 e mAb C[PD-1]_L1.135; mAb C[PD-1]_H2 e mAb C[PD-1]_L1.140; e mAb C[PD-1]_H2 e mAb C[PD-1]_L2.

[00271] Algumas modalidades da invenção compreendem pelo menos um domínio scFv, que, embora de não ocorrência natural, geralmente inclui

um domínio pesado variável e um domínio leve variável, ligados juntos por um ligante scFv. Como delineado no presente documento, embora o domínio scFv seja geralmente do terminal N ao terminal C orientado como vh-ligante scFv-vl, isso pode ser invertido para qualquer um dos domínios scFv (ou aqueles construídos com o uso das sequências vh e vl dos Fabs), ao vl-ligante scFv-vh, com ligantes opcionais em uma ou ambas as extremidades dependendo do formato (consultar geralmente Figuras 4A a 4B do documento US 62/353.511).

[00272] Como mostrado no presente documento, o anti-PD-1 ABD pode estar na forma de um scFv, em que os domínios vh e vl são unidos com o uso de um ligante de scFv, que pode ser opcionalmente um ligante de scFv carregado. Como será observado pelas pessoas versadas na técnica, o scFv pode ser montado do terminal N ao terminal C como N-vh-scFv ligante-vl-C ou como N-vl-scFv ligante-vh-C, com o terminal C do domínio scFv que é ligado geralmente ao domínio de Fc dobradiça-CH2-CH3. Fvs adequados (incluindo conjuntos de CDR e domínios variáveis pesados/leves variáveis) podem ser usados em formatos scFv ou formatos Fab são mostrados na Figura 43. Como será observado pelas pessoas versadas na técnica, toda a dobradiça ou parte da mesma (que também pode ser uma dobradiça de tipo selvagem da IgG1, IgG2 ou IgG4 ou uma variante da mesma, tal como a variante de dobradiça da IgG4 S241P ou S228P com a prolina de substituição na posição 228 em relação ao polipeptídeo parental de dobradiça da IgG4 (em que a numeração S228P está de acordo com o índice EU e o S241P é a numeração Kabat)) pode ser usada como o ligante de domínio entre o scFv e o domínio CH2-CH3, ou um ligante de domínio diferente, tal como retratado nas Figuras, pode ser usado.

C. DOMÍNIOS DE FC

[00273] Além dos complexos de IL-15 e dos domínios Fv de NC-αPD-1 de direcionamento, a invenção fornece ainda domínios Fc heterodiméricos

como um componente. Como mostrado na Figura 28, esses domínios Fc heterodiméricos servem para trazer os domínios IL-15/Rα e os domínios anti-PD-1 direcionados juntos em um único construto, geralmente que compreende duas cadeias polipeptídicas (por exemplo, a Figura 28A, em que um monômero compreende o Complexo IL-15/Rα e o outro monômero compreende o scFv anti-PD-1), três cadeias polipeptídicas (por exemplo, a Figura 28C, em que um monômero compreende o complexo IL-15/Rα, um segundo monômero compreende uma cadeia pesada e o terceiro monômero é a cadeia leve), etc.

[00274] O componente de domínio de Fc da invenção é como descrito no presente documento, que contém geralmente variantes de enviesamento e/ou variantes de pI opcionais e/ou variantes de ablação são delineadas no presente documento. Consultar, por exemplo, a divulgação do documento nº WO2017/218707 sob o título "IV Heterodimeric Antibodies", incluindo as seções IV.A, IV.B, IV.C, IV.D, IV.E, IV.F, IV.G, IV.H e IV.I, todos expressamente incorporados a título de referência em sua totalidade. De uso particular nas proteínas heterodiméricas da presente invenção são os domínios Fc contendo "variantes de enviesamento", "variantes pI", "variantes de ablação" e variantes FcRn como delineado no presente documento. Domínios Fc particularmente úteis são aqueles mostrados na Figura 8.

[00275] Os domínios Fc podem ser derivados de domínios Fc de IgG, por exemplo, domínios Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4, com domínios Fc de IgG1 que têm uso particular na invenção. A seguir, são descritos domínios de Fc que são úteis para monômeros de fusão IL-15/IL-15Rα Fc e fragmentos de anticorpo de ponto de verificação das proteínas heterodiméricas biespecíficas da presente invenção.

[00276] Desse modo, a presente invenção fornece diferentes domínios de anticorpo, por exemplo, diferentes domínios de Fc. Como descrito no presente documento e conhecido na técnica, as proteínas heterodiméricas da

invenção compreendem domínios diferentes, que podem ser sobrepostos também. Esses domínios incluem, porém sem limitação, o domínio Fc, o domínio CH1, o domínio CH2, o domínio CH3, o domínio de dobradiça e o domínio constante pesado (domínio CH1-dobradiça-Fc ou CH1-dobradiça-CH2-CH3).

[00277] Desse modo, o "domínio de Fc" inclui o domínio -CH2-CH3, e opcionalmente um domínio de dobradiça, e pode ser da IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana, com domínios de Fc derivados da IgG1. Em algumas das modalidades no presente documento, quando um fragmento de proteína, por exemplo IL-15 ou IL-15Rα, é fixado a um domínio de Fc, o mesmo é o terminal C do construto de IL-15 ou IL-15Rα que é fixado a toda dobradiça do domínio de Fc ou a uma parte da mesma; por exemplo, é geralmente fixada à sequência EPKS, que é o início da dobradiça. Em outras modalidades, quando um fragmento de proteína, por exemplo, IL-15 ou IL-15Rα, é fixado a um domínio de Fc, o mesmo é o terminal C do construto IL-15 ou IL-15Rα que é fixado ao domínio CH1 do domínio de Fc.

[00278] Em alguns dos construtos e sequências delineadas no presente documento de uma proteína de domínio de Fc, o terminal C do fragmento da proteína IL-15 ou proteína IL-15Rα é fixado ao terminal N de um ligante de domínio cujo terminal C é fixado ao terminal N de um domínio de Fc constante (fragmento-ligante-domínio de Fc-C da proteína N-IL-15 ou IL-15Rα) embora isso possa ser alterado (N-domínio de Fc-ligante- IL-15 ou fragmento -C da proteína IL-15Rα). Em outros construtos e sequências descritos no presente documentos, o terminal C de um primeiro fragmento de proteína está ligado ao terminal N de um segundo fragmento de proteína, opcionalmente através de um ligante de domínio, o terminal C do segundo fragmento de proteína está ligado ao terminal N de um domínio Fc constante, opcionalmente através de um ligante de domínio. Ainda em outros construtos e sequências descritos no presente documentos, um domínio Fc constante que

não está ligado a um primeiro fragmento de proteína ou a um segundo fragmento de proteína é fornecido. Uma proteína de fusão Fc de heterodímero pode conter duas ou mais das proteínas de domínio Fc monoméricas exemplificativas descritas no presente documento.

[00279] Consequentemente, em algumas modalidades a presente invenção fornece proteínas de fusão Fc heterodiméricas que dependem do uso de duas sequências Fc variantes de cadeia pesada diferentes, que se automontam para formar polipeptídeos de fusão de domínio Fc heterodimérico que permitem a ligação a um ou mais parceiros de ligação, ligantes ou receptores. Os construtos de fusão Fc heterodiméricos são com base na natureza de automontagem dos dois domínios Fc das cadeias pesadas de anticorpos, por exemplo, dois "monômeros" que se agrupam em um "dímero". As fusões Fc heterodiméricas são feitas alterando-se a sequência de aminoácidos de cada monômero como discutido mais detalhadamente abaixo. Assim, a presente invenção é geralmente direcionada à criação de proteínas de fusão Fc heterodiméricas que podem coenvolver parceiro (ou parceiros) de ligação ou ligante (ou ligantes) ou receptor (ou receptores) de várias maneiras, dependendo das variantes de aminoácidos nas regiões constantes que são diferentes em cada cadeia para promover a formação heterodimérica e/ou permitir a facilidade de purificação de heterodímeros sobre os homodímeros.

1. VARIANTES DE HETERODIMERIZAÇÃO

[00280] As proteínas de fusão IL-15/Rα X NCPD-1-Fc heterodiméricas incluem dois domínios Fc diferentes (um em cada um dentre o primeiro e o segundo monômeros) que incluem modificações que facilitam a heterodimerização do primeiro e do segundo monômeros e/ou permitem a facilidade de purificação de heterodímeros sobre homodímeros, coletivamente referidos neste documento como "variantes de heterodimerização". Como discutido abaixo, as variantes de heterodimerização podem incluir variantes de enviesamento (por exemplo, variantes que "enviesam" a formação de

heterodímeros sobre homodímeros, descritos abaixo), bem como "variantes de pI" que facilitam a separação de homodímeros de heterodímeros. Como é geralmente descrito na Patente nº US 9.605.084, incorporada neste documento a título de referência em sua totalidade e especificamente como abaixo para a discussão de variantes de heterodimerização, mecanismos adicionais úteis para heterodimerização incluem "botões e orifícios" ("KIH"), como descrito na Patente nº US 9.605.084, "direção eletrostática" ou "pares de carga", como descrito na Patente nº US 9.605.084, variantes de pI como descrito na Patente nº US 9.605.084 e variantes Fc adicionais gerais como descrito na Patente nº US 9.605.084 e abaixo.

A. VARIANTES DE ENVIESAMENTO

[00281] Em algumas modalidades, as proteínas de fusão heterodiméricas incluem variantes de enviesamento, que são uma ou mais modificações de aminoácidos em um primeiro domínio Fc (A) e/ou um segundo domínio Fc (B) que favorece a formação de heterodímeros Fc (dímeros Fc que incluem o primeiro e o segundo domínio Fc; A-B) sobre homodímeros Fc (dímeros Fc que incluem dois do primeiro domínio Fc ou dois do segundo domínio Fc; A-A ou B-B). Variantes de enviesamento adequadas estão incluídas na Figura 29 do pedido de Publicação nº US 2016/0355608, incorporado neste documento a título de referência em sua totalidade e especificamente para a sua divulgação de variantes de enviesamento, bem como na Figura 4.

[00282] Um mecanismo para variantes de enviesamento é referido na técnica como "botões e furos", referindo-se à modificação de aminoácidos que cria influências estéricas para favorecer a formação heterodimérica e desfavorecer a formação homodimérica, como descrito no documento nº USSN 61/596.846, Ridgway et al., Protein Engineering 9 (7): 617 (1996); Atwell et al, J. Mol. Biol. 1997 270: 26; o documento de Patente nº U.S. 8.216.805, em que todos estão incorporados no presente documento a título de

referência em sua totalidade e especificamente para a divulgação de mutações de “botões e furos”. Isso é às vezes referido como “variantes estéricas”. As Figuras identificam um número de pares “monômero A - monômero B” que dependem de “botões e furos”. Além disso, como descrito em Merchant et al., Nature Biotech. 16: 677 (1998), essas mutações de “botões e furos” podem ser combinadas com ligações de dissulfeto para favorecer a formação de heterodímeros de Fc.

[00283] Um mecanismo adicional para variantes de enviesamento que é útil na geração de heterodímeros é por vezes referido como “direção eletrostática”, como descrito em Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285 (25):19.637 (2010), incorporado a título de referência em sua totalidade. Isso é às vezes referido no presente documento como “pares de carga”. Nessa modalidade, eletrostáticas são usadas para enviesar a formação em direção à heterodimerização. Como aqueles versados na técnica verificarão, essas também podem ter um efeito sobre pI e, assim, na purificação e, assim, também podem ser consideradas variantes de pI. No entanto, como essas foram geradas para forçar a heterodimerização e não foram usadas como ferramentas de purificação, elas são classificados como “variantes estéricas”. Essas incluem, porém sem limitação, D221E/P228E/L368E pareados com D221R/P228R/K409R (por exemplo, esses são “conjuntos de monômero correspondentes”) e C220E/P228E/368E pareados com C220R/E224R/P228R/K409R.

[00284] Em algumas modalidades, as variantes de enviesamento favorecem vantajosamente e simultaneamente a heterodimerização com base no mecanismo de “botões e orifícios”, bem como no mecanismo de “direção eletrostática”. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão heterodiméricas incluem um ou mais conjuntos de tais variantes de enviesamento de heterodimerização. Variantes de inclinação exemplificativas que se enquadram nesta categoria incluem: S364K/E357Q: L368D/K370S;

L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L; K370S: S364K/E357Q; ou um T366S/L368A/Y407V: T366W (opcionalmente incluindo um dissulfeto de ponte, T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C). Essas variantes são em "pares" de "conjuntos". Isto é, um conjunto do par é incorporado no primeiro monômero e o outro conjunto do par é incorporado no segundo monômero. Em termos de nomenclatura, o par "S364K/E357Q: L368D/K370S" significa que um dos monômeros inclui um domínio Fc que inclui as substituições de aminoácidos S364K e E357Q e o outro monômero inclui um domínio Fc que inclui as substituições de aminoácidos L368D e K370S; como acima, o "encalhe" desses pares depende do pI inicial. Deve-se notar que esses conjuntos não se comportam necessariamente como variantes "botões em orifícios", com uma correspondência de um para um entre um resíduo em um monômero e um resíduo no outro. Ou seja, esses pares de conjuntos formam uma interface entre os dois monômeros que estimula a formação de heterodímeros e desencoraja a formação de homodímeros, o que permite que a porcentagem de heterodímeros que se formam espontaneamente sob condições biológicas seja superior a 90%, em vez dos esperados 50% (25% de homodímero A/A: 50% de heterodímero A/B: 25% de homodímero B/B). Variantes de "inclinação" de heterodimerização exemplificativas são retratadas na Figura 4.

[00285] Em modalidades exemplificativas, as proteínas de fusão heterodiméricas incluem um S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L; K370S: S364K/E357Q; ou um T366S/L368A/Y407V: T366W (opcionalmente incluindo um dissulfeto de ponte, T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C) conjunto de substituição de aminoácido variante "enviesado". Em uma modalidade exemplificativa, a proteína de fusão IL-15-Fc heterodimérica inclui um

conjunto de substituição de aminoácidos “S364K/E357Q: L368D/K370S”.

[00286] Em algumas modalidades, as variantes de enviesamento fornecidas neste documento podem ser opcionalmente e independentemente incorporadas com quaisquer outras modificações, incluindo, porém sem limitação, outras variantes de enviesamento (consultar, por exemplo, na Figura 37 do pedido de publicação nº US 2012/0149876, incorporado no presente documento a título de referência, particularmente para a sua divulgação de variantes distorcidas), variantes pI, variantes isotípicas, variantes FcRn, variantes de ablação, etc., em um ou ambos o primeiro e o segundo domínios Fc da proteína de fusão de IL-15-Fc. Além disso, as modificações individuais também podem ser independentemente e opcionalmente incluídas ou excluídas das proteínas de fusão de IL-15-Fc em questão.

B. VARIANTES DE PI (PONTO ISOELÉTRICO) PARA HETERODÍMEROS

[00287] Em algumas modalidades, as proteínas de fusão heterodiméricas incluem variantes de purificação que permitem vantajosamente a separação de proteínas de fusão heterodiméricas de proteínas homodiméricas.

[00288] Existem vários mecanismos básicos que podem facilitar a purificação de proteínas heterodiméricas. Um tal mecanismo depende do uso de variantes pI que incluem uma ou mais modificações que afetam o ponto isoelétrico de um ou ambos os monômeros da proteína de fusão, de modo que cada monômero, e subsequentemente cada espécie dimérica, tem um pI diferente, permitindo assim a purificação isoelétrica de proteínas diméricas A-A, A-B e B-B. Alternativamente, alguns formatos também permitem a separação com base no tamanho. Como é adicionalmente delineado abaixo, também é possível “enviesar” a formação de heterodímeros sobre homodímeros usando variantes de enviesamento. Assim, uma combinação de

variantes de enviesamento de heterodimerização e variantes de pI são particularmente úteis nas proteínas de fusão de IL-15 em questão fornecidas no presente documento.

[00289] Adicionalmente, como delineado mais completamente abaixo, dependendo do formato da proteína de fusão Fc de heterodímero, as variantes de pI podem estar contidas nos domínios constante e/ou Fc de um monômero, ou podem ser usados ligantes de domínios. Em algumas modalidades, a proteína de fusão IL-15-Fc heterodimérica inclui modificações adicionais para funcionalidades alternativas que também podem criar alterações de pI, tais como variantes Fc, FcRn e KO.

[00290] Nas modalidades que utilizam pI como um mecanismo de separação para permitir a purificação de proteínas de fusão heterodiméricas, as modificações de aminoácidos podem ser introduzidas em um ou em ambos os monômeros da proteína de fusão heterodimérica. Ou seja, o pI de um dos monômeros (denominado no presente documento, por simplicidade, "monômero A") pode ser modificado para longe do monômero B, ou ambos os monômeros A e B podem ser alterados, sendo que o pI do monômero A aumenta e o pI de monômero B diminui. Como discutido, as alterações de pI de um ou ambos os monômeros podem ser feitas removendo-se ou adicionando-se um resíduo carregado (por exemplo, um aminoácido neutro é substituído por um resíduo de aminoácido positiva ou negativamente carregado, por exemplo, glutamina a ácido glutâmico), alterando-se um resíduo carregado de positivo ou negativo para a carga oposta (por exemplo, ácido aspártico para lisina) ou alterando-se um resíduo carregado para um resíduo neutro (por exemplo, perda de uma carga; lisina para serina). Algumas dessas variantes são mostradas nas Figuras, incluindo as Figuras 4 e 5.

[00291] A criação de uma mudança suficiente em pI em pelo menos um dos monômeros de modo que os heterodímeros possam ser separados dos

homodímeros pode ser feita usando uma região constante de cadeia pesada de "tipo selvagem" e uma região variante que foi projetada para aumentar ou diminuir seu pI (A : B+ wt ou A: B- wt), ou aumentando-se uma região e diminuindo-se a outra região (A+: B- ou A-: B+).

[00292] Assim, em geral, um componente de algumas modalidades da presente invenção são variantes de aminoácidos nas regiões constantes que são direcionadas para alterar o ponto isoelétrico (pI) de pelo menos um, se não ambos, dos monômeros de uma proteína dimérica incorporando-se substituições de aminoácidos ("variantes de pI" ou "substituições de pI") em um ou ambos os monômeros. A separação dos heterodímeros dos dois homodímeros pode ser concluída se os pIs dos dois monômeros diferirem por tão pouco quanto unidade de 0,1 pH, com 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 ou mais com uso na presente invenção.

[00293] Como será apreciado pelos especialistas na técnica, o número de variantes de pI a ser incluído em cada um ou em ambos os monômeros para obter uma boa separação dependerá em parte do pI de partida dos componentes. Ou seja, para determinar qual monômero modificar ou em qual "direção" (por exemplo, mais positivo ou mais negativo), as sequências dos domínios Fc e qualquer ligante ou complexo de IL-15 incluído em cada monômero são calculados e uma decisão é feita a partir daí com base nos pIs dos monômeros. Como é conhecido na técnica, diferentes domínios Fc, ligantes e complexos de IL-15 terão diferentes pIs de partida. Em geral, como delineado no presente documento, os pIs são modificados para resultar em uma diferença de pI total de cada monômero de pelo menos cerca de 0,1 log, sendo que 0,2 a 0,5 são preferenciais como delineado no presente documento.

[00294] Em geral, como será apreciado pelos especialistas na técnica, há duas categorias gerais de modificações de aminoácido que afetam o pI: aquelas que aumentam o pI da proteína (alterações básicas) e aquelas que diminuem o pI da proteína (alterações ácidas). Como descrito neste

documento, todas as combinações dessas variantes podem ser usadas: um monômero pode incluir um domínio Fc de tipo selvagem ou um domínio Fc variante que não exibe um pI significativamente diferente do tipo selvagem e o outro monômero inclui um domínio Fc que é mais básico ou mais ácido. Alternativamente, cada monômero é alterado, um para mais básico e outro para mais ácido.

[00295] No caso em que as variantes de pI são usadas para alcançar a heterodimerização, é fornecida uma abordagem mais modular para projetar e purificar proteínas de fusão Fc heterodiméricas. Assim, em algumas modalidades, as variantes de heterodimerização (incluindo variantes de heterodimerização de inclinação e purificação) devem ser modificadas. Além disso, em algumas modalidades, a possibilidade de imunogenicidade resultante das variantes de pI é significativamente reduzida importando-se variantes de pI de diferentes isótopos de IgG, de tal modo que pI seja alterado sem introduzir imunogenicidade significativa. Assim, um problema adicional a ser resolvido é a elucidação de domínios constantes de pI baixo com elevado teor de sequência humana, por exemplo a minimização ou evitação de resíduos não humanos em qualquer posição particular. Alternativamente ou além das substituições isotípicas, a possibilidade de imunogenicidade resultante das variantes pI é significativamente reduzida pela utilização de substituições isostéricas (por exemplo, Asn para Asp; e Gln para Glu).

[00296] Um benefício colateral que pode ocorrer com essa modificação de pI também é a extensão da meia-vida sérica e o aumento da ligação FcRn. Ou seja, como descrito no Pedido de Publicação nº US 2012/0028304 (incorporado a título de referência na sua totalidade e especificamente para a divulgação de variantes de pI que fornecem função adicional), a redução do pI de domínios constantes de anticorpo (incluindo aqueles encontrados em fusões Fc) pode levar a uma retenção de soro mais longa in vivo. Essas variantes de pI para meia-vida sérica aumentada também facilitam as

alterações de pI para purificação.

[00297] Adicionalmente, deve-se notar que as variantes de pI das variantes de heterodimerização fornecem um benefício adicional para o processo de controle analítico e de qualidade das proteínas de fusão Fc, uma vez que a capacidade para eliminar, minimizar e distinguir quando os homodímeros estiverem presentes é significativa. Da mesma forma, a capacidade de testar com fiabilidade a reprodutibilidade da produção da proteína de fusão Fc heterodimérica é importante.

[00298] Combinações exemplificativas de variantes pI são mostradas nas Figuras 4 e 5, e na Figura 30 do Pedido de Publicação nº US 2016/0355608, todos os quais são incorporados no presente documento a título de referência em sua totalidade e especificamente para a divulgação de variantes de pI. Como delineado no presente documento e mostrado nas Figuras, essas alterações são apresentadas em relação à IgG1, mas todos os isótopos podem ser alterados dessa maneira, assim como os híbridos de isótopos. No caso em que o domínio constante da cadeia pesada é de IgG2 a IgG4, R133E e R133Q também podem ser usados.

[00299] Em uma modalidade, as proteínas de fusão heterodiméricas incluem um monômero com um domínio Fc variante tendo modificações de variante de pI 295E/384D/418E/421D (Q295E/N384D/Q418E/N421D quando em relação a IgG1 humana). Em uma modalidade, as proteínas de fusão heterodiméricas incluem um monômero com um domínio Fc variante tendo modificações de variante de pI 217R/228R/276K (P217R/P228R/N276K quando em relação ao IgG1 humano). Modificações de variante de pI exemplificativas adicionais que podem ser incorporadas no domínio Fc de um sujeito são retratadas na Figura 5.

[00300] Em algumas modalidades, as mutações são feitas na dobradiça do domínio Fc, que inclui as posições 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, e 230 com base na numeração EU. Assim,

mutações de pI e particularmente substituições podem ser feitas em uma ou mais das posições 216 a 230, em que 1, 2, 3, 4 ou 5 mutações são usadas na presente invenção. Novamente, todas as combinações possíveis são contempladas, sozinhas ou com outras variantes de pI em outros domínios.

[00301] Substituições específicas que são usadas na diminuição do pI de domínios de dobradiça incluem, mas não são limitadas a uma deleção na posição 221, uma valina ou treonina não nativa na posição 222, uma deleção na posição 223, um ácido glutâmico não nativo na posição 224, uma deleção na posição 225, uma deleção na posição 235 e uma deleção ou uma alanina não nativa na posição 236. Em alguns casos, apenas substituições de pI são feitas no domínio de dobradiça, e em outros, essas substituições são adicionadas a outras variantes de pI em outros domínios em qualquer combinação.

[00302] Em algumas modalidades, as mutações podem ser feitas na região CH2, incluindo as posições 233, 234, 235, 236, 274, 296, 300, 309, 320, 322, 326, 327, 334 e 339, com base na numeração EU. Deve-se notar que as alterações em 233 a 236 podem ser feitas para aumentar a função efetora (junto com 327A) na estrutura de IgG2. Novamente, todas as combinações possíveis dessas 14 posições podem ser feitas; por exemplo, uma proteína de fusão de IL-15-Fc pode incluir um domínio de Fc de variante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições de pI de CH2.

[00303] Substituições específicas que são úteis na redução do pI dos domínios CH2 incluem, porém sem limitação, glutamina não nativa ou ácido glutâmico na posição 274, uma fenilalanina não nativa na posição 296, uma fenilalanina não nativa na posição 300, uma valina não nativa na posição 309, um ácido glutâmico não nativo na posição 320, um ácido glutâmico não nativo na posição 322, um ácido glutâmico não nativo na posição 326, uma glicina não nativa na posição 327, um ácido glutâmico nativo na posição 334, uma treonina não nativa na posição 339, e todas as combinações possíveis

dentro de CH2 e com outros domínios.

[00304] Nessa modalidade, as mutações podem ser independente e opcionalmente selecionadas a partir das posições 355, 359, 362, 384, 389, 392, 397, 418, 419, 444 e 447 (numeração EU) da região CH3. Substituições específicas que são úteis na diminuição do pI de domínios CH3 incluem, porém sem limitação, glutamina não nativa ou ácido glutâmico na posição 355, uma serina não nativa na posição 384, uma asparagina não nativa ou ácido glutâmico na posição 392, uma metionina não nativa na posição 397, um ácido glutâmico não nativo na posição 419, um ácido glutâmico não nativo na posição 359, um ácido glutâmico não nativo na posição 362, um ácido glutâmico não nativo na posição 389, um ácido glutâmico não nativo na posição 418, um ácido glutâmico não nativo na posição 444 e uma deleção ou ácido aspártico não nativo na posição 447.

C. VARIANTES ISOTÍPICAS

[00305] Além disso, muitas modalidades da invenção baseiam-se na "importação" de aminoácidos de pI em posições particulares de um isótopo de IgG para outro, assim, se reduz ou elimina a possibilidade de imunogenicidade indesejada que é introduzida nas variantes. Diversas dessas são mostradas na Figura 21 do Pedido de Publicação nº US 2014/0370013, incorporado no presente documento a título de referência, particularmente para a sua divulgação de variantes isotípicas. Ou seja, a IgG1 é um isótopo comum para anticorpos terapêuticos por várias razões, que incluem alta função efetora. No entanto, a região constante pesada de IgG1 tem um pI maior do que o de IgG2 (8,10 contra 7,31). Introduzindo-se os resíduos de IgG2 em posições particulares na estrutura de IgG1, o pI do monômero resultante é diminuído (ou aumentado) e, adicionalmente, exibe uma meia-vida sérica mais longa. Por exemplo, a IgG1 tem uma glicina (pI 5,97) na posição 137 e a IgG2 tem um ácido glutâmico (pI 3,22); a importação do ácido glutâmico afetará o pI da proteína resultante. Como é descrito abaixo,

diversas substituições de aminoácidos são normalmente necessárias para afetar significativamente o pI da proteína de fusão Fc variante. No entanto, deve-se notar, como discutido abaixo, que até mesmo as alterações nas moléculas de IgG2 permitem uma meia-vida sérica aumentada.

[00306] Em outras modalidades, alterações de aminoácidos não isotípicas são realizadas, seja para reduzir o estado de carga geral da proteína resultante (por exemplo, alterando-se um aminoácido de pI superior para um aminoácido de pI inferior) ou para permitir acomodações na estrutura para estabilidade, etc., como é adicionalmente descrito abaixo.

[00307] Além disso, por modificação de pI de ambos os domínios constantes pesados e leves, alterações significativas em cada monômero do heterodímero podem ser observadas. Como discutido no presente documento, ter os pIs dos dois monômeros diferindo em pelo menos 0,5 pode permitir a separação por cromatografia de troca iônica ou foco isoelétrico, ou outros métodos sensíveis ao ponto isoelétrico.

D. CÁLCULO DE PI

[00308] O pI de cada monômero pode depender do pI do domínio constante da cadeia pesada variante e do pI do monômero total, que inclui o domínio constante variante da cadeia pesada e o parceiro de fusão. Assim, em algumas modalidades, a alteração em pI é calculada com base no domínio constante de cadeia pesada variante, com o uso do gráfico na Figura 19 do Pedido de Publicação nº U.S. 2014/0370013. Como discutido no presente documento, qual monômero modificar é geralmente decidido pelo pI inerente de cada monômero.

E. VARIANTES DE PI QUE TAMBÉM CONFEREM MELHOR LIGAÇÃO IN VIVO DE FCRN

[00309] No caso em que a variante de pI diminui o pI do monômero, os mesmos podem ter o benefício adicional de melhorar a retenção do soro in vivo.

[00310] Embora ainda sob exame, acredita-se que as regiões Fc tenham meias-vidas mais longas in vivo, porque a ligação a FcRn em pH 6 em um endossomo sequestra o Fc (Ghetie e Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592 a 598, incorporado a título de referência em sua totalidade). O compartimento endossômico então recicla o Fc na superfície da célula. Uma vez que o compartimento se abre para o espaço extracelular, o pH mais alto, aproximadamente 7,4, induz a liberação de Fc de volta ao sangue. Em camundongos, Dall 'Acqua et al., demonstraram que os mutantes Fc com ligação aumentada de FcRn a pH 6 e pH 7,4 reduziram efetivamente as concentrações séricas e a mesma meia-vida que Fc de tipo selvagem (Dall 'Acqua et al., 2002, J. Immunol. 169:5.171-5.180, incorporado a título de referência em sua totalidade). Acredita-se que a afinidade aumentada de Fc para FcRn a pH 7,4 proíbe a liberação de Fc de volta ao sangue. Portanto, as mutações Fc que aumentarão a meia-vida de Fc in vivo, idealmente, aumentarão a ligação de FcRn no pH mais baixo, enquanto ainda permitirão a liberação de Fc em pH mais alto. O aminoácido histidina altera seu estado de carga na faixa de pH de 6,0 a 7,4. Portanto, não é surpreendente encontrar seus resíduos de His em posições importantes no complexo Fc/FcRn.

2. VARIANTES DE FC ADICIONAIS PARA FUNCIONALIDADE ADICIONAL

[00311] Para além das variantes de aminoácidos de pI, há diversas modificações de aminoácidos Fc úteis que podem ser feitas por uma variedade de razões, que incluem, porém sem limitação, a alteração da ligação a um ou mais receptores FcγR, ligação alterada a receptores FcRn, etc.

[00312] Consequentemente, as proteínas da invenção podem incluir modificações de aminoácidos, que incluem as variantes de heterodimerização delineadas no presente documento, que incluem as variantes de pI e variantes estéricas. Cada conjunto de variantes pode ser independente e opcionalmente incluído ou excluído de qualquer proteína heterodimérica particular.

A. VARIANTES DE FcγR

[00313] Consequentemente, há várias substituições de Fc úteis que podem ser feitas para alterar a ligação a um ou mais dentre os receptores FcγR. As substituições que resultam em ligação aumentada, assim como diminuição da ligação, podem ser úteis. Por exemplo, sabe-se que a ligação aumentada em FcγRIIIa resulta em ADCC aumentada (citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos; a reação mediada por células em que as células citotóxicas não específicas que expressam FcγRs reconhecem o anticorpo ligado a uma célula-alvo e subsequentemente provocam a lise da célula-alvo). De modo semelhante, a ligação diminuída em FcγRIIb (um receptor inibidor) pode ser benéfica também em algumas circunstâncias. As substituições de aminoácidos que são úteis na presente invenção incluem aquelas listadas nos documentos nº de Série USSNs 11/124.620 (particularmente a Figura 41), 11/174.287, 11/396.495, 11/538.406, em que todos estão incorporados no presente documento a título de referência em sua totalidade e especificamente para as variantes divulgadas nos mesmos. Variantes particulares que são úteis incluem, porém sem limitação, a 236A, 239D, 239E, 332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D, 332E/330L, 243A, 243L, 264A, 264V e 299T.

[00314] Adicionalmente, as substituições de aminoácidos que aumentam a afinidade para FcγRIIc podem também ser incluídas nas variantes de domínio Fc delineadas no presente documento. As substituições descritas, por exemplo, nos documentos nº USSNs 11/124.620 e 14/578.305 são úteis.

[00315] Adicionalmente, há substituições de Fc adicionais que são úteis na ligação aumentada ao receptor FcRn e meia-vida sérica aumentada, como especificamente divulgado no documento nº USSN 12/341.769, incorporado no presente documento a título de referência em sua totalidade,

incluindo, porém sem limitação, a 434S, 434A, 428L, 308F, 259I, 428L/434S, 259I/308F, 436I/428L, 436I ou V/434S, 436V/428L e 259I/308F/428L.

B. VARIANTES DE ABLAÇÃO

[00316] Da mesma forma, outra categoria de variantes funcionais é "variantes de ablação de FcγR" ou variantes de "Fc knockout (FcKO ou KO)". Nessas modalidades, para algumas aplicações terapêuticas, é desejável reduzir ou remover a ligação normal do domínio Fc em um ou mais ou todos os receptores de Fcγ (por exemplo, FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, etc.) para evitar mecanismos de ação adicionais. Isto é, por exemplo, em muitas modalidades, particularmente na utilização de anticorpos biespecíficos imunomoduladores desejáveis para eliminação da ligação de FcγRIIIa para eliminar ou reduzir significativamente a atividade de ADCC de modo que um dos domínios Fc compreenda uma ou mais variantes de eliminação de receptor de Fc. Essas variantes de ablação são retratadas na Figura 31 do documento nº USSN 15/141.350, em que todas essas estão incorporadas no presente documento a título de referência em sua totalidade, e cada uma pode ser independente e opcionalmente incluída ou excluída, com aspectos preferenciais com o uso de variantes de ablação selecionadas a partir do grupo que consiste em G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G e E233P/L234V/L235A/G236del de acordo com o índice EU. Deve-se notar que as variantes de ablação citadas no presente documento ablacionam a ligação de FcγR, mas geralmente não a ligação de FcRn.

[00317] As modalidades exemplificativas de variantes de pI são fornecidas na Figura 5.

3. COMBINAÇÃO DE VARIANTES DE FC E HETERODIMÉRICAS

[00318] Como será apreciado pelos especialistas na técnica, todas as

variantes de heterodimerização citadas (incluindo variantes de enviesamento e/ou pI) podem ser combinadas opcional e independentemente de qualquer forma, desde que mantenham seu “encalhamento” ou sua “divisão de monômero”. Além disso, todas essas variantes podem ser combinadas em qualquer um dos formatos de heterodimerização.

[00319] No caso de variantes de pI, embora modalidades que encontram uso particular sejam mostradas nas Figuras, outras combinações podem ser geradas, seguindo a regra básica de alterar a diferença de pI entre dois monômeros para facilitar a purificação.

[00320] Adicionalmente, qualquer uma das variantes de heterodimerização, inclinação e pI, são também independente e opcionalmente combinadas com variantes de ablação de Fc, variantes de Fc, variantes de FcRn, como geralmente descrito no presente documento.

[00321] Adicionalmente, um domínio Fc monomérico pode compreende um conjunto de substituições de aminoácidos que inclui C220S/S267K/L368D/K370S ou C220S/S267K/S364K/E357Q.

[00322] Adicionalmente, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas podem compreende variantes de enviesamento (por exemplo, um conjunto de substituições de aminoácidos como mostrado nas Figuras 1A a 1C do documento nº USSN 15/141.350, em que todas essas estão incorporadas no presente documento a título de referência em sua totalidade), em que variantes de enviesamento particularmente úteis são selecionadas a partir do grupo que consiste em S364K/E357Q : L368D/K370S; L368D/K370S : S364K; L368E/K370S : S364K; T411T/E360E/Q362E : D401K; L368D/K370S : S364K/E357L, K370S : S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V: T366W e T366S/L368A/Y407V/Y349C : T366W/S354C, opcionalmente variantes de ablação, ligantes de domínio opcionalmente carregados e a cadeia pesada compreende variantes de pI.

[00323] Em algumas modalidades, o domínio Fc que compreende uma

substituição de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em: 236R, 239D, 239E, 243L, M252Y, V259I, 267D, 267E, 298A, V308F, 328F, 328R, 330L, 332D, 332E, M428L, N434A, N434S, 236R/328R, 239D/332E, M428L, 236R/328F, V259I/V308F, 267E/328F, M428L/N434S, Y436I/M428L, Y436V/M428L, Y436I/N434S, Y436V/N434S, 239D/332E/330L, M252Y/S254T/T256E, V259I/V308F/M428L, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, G236R/L328R e PVA/S267K. Em alguns casos, o domínio Fc compreende a substituição de aminoácidos 239D/332E. Em outros casos, o domínio Fc compreende a substituição de aminoácidos G236R/L328R ou PVA/S267K.

[00324] Em uma modalidade, uma combinação particular de variantes de enviesamento e pI que é útil na presente invenção é T366S/L368A/Y407V : T366W (incluindo opcionalmente uma ponte de dissulfeto, T366S/L368A/Y407V/Y349C : T366W/S354C) em que um monômero compreende Q295E/N384D/Q418E/N481D e o outro um ligante de domínio positivamente carregado. Como será apreciado na técnica, as variantes de "botões em furos" não alteram pI e, portanto, podem ser usadas em qualquer um dos monômeros.

[00325] Em uma modalidade, uma combinação particular de variantes de enviesamento e pI que encontra uso na presente invenção é L368D/K370S: S364K/E357Q com um monômero que compreende Q295E/N384D/Q418E/N421D.

[00326] Pares úteis de conjuntos de variantes de dimermização Fc (incluindo variantes de enviesamento e pI) são fornecidos nas Figuras 4A a 4E. Variantes adicionais de pI são fornecidas na Figura 5. Variantes de ablação úteis são fornecidas na Figura 6. Modalidades úteis dos componentes não citocinas das proteínas de fusão heterodiméricas IL-15/Rα x anti-PD1 ABD da presente invenção são fornecidas nas Figuras 7A a 7E e 8A a 8F.

D. LIGANTES DE DOMÍNIO

[00327] Os três componentes da invenção, o Fv anti-PD-1, o complexo Il-15/Rα e os domínios Fc de heterodimerização da invenção são opcionalmente ligados entre si usando ligantes de domínio. Embora a ligação covalente direta possa ser feita (por exemplo, ligando o terminal C do complexo IL-15 ao terminal N do domínio CH2 do domínio Fc), em geral, são usados ligantes que fornecem flexibilidade e, às vezes, funcionam.

[00328] Em algumas modalidades, uma proteína IL-15 é fixada ao terminal N de um domínio de Fc, e uma proteína IL-15Rα é fixada ao terminal N da proteína IL-15. Em outras modalidades, uma proteína IL-15Rα é fixada ao terminal N de um domínio de Fc e a proteína IL-15Rα é fixada de maneira não covalente a uma proteína IL-15. Em ainda outras modalidades, uma proteína IL-15Rα é fixada ao terminal C de um domínio de Fc e a proteína IL-15Rα é fixada de maneira não covalente a uma proteína IL-15.

[00329] Em algumas modalidades, a proteína IL-15 e a proteína IL-15Rα estão ligadas juntas por meio de um ligante (por exemplo, um formato "scIL-15/Rα"). Opcionalmente, as proteínas não são fixadas por meio de um ligante e utilizam ligações de dissulfeto ou de automontagem nativa, como delineado no presente documento. Em outras modalidades, a proteína IL-15 e proteína IL-15Rα são fixadas não covalentemente. Em algumas modalidades, a proteína IL-15 é ligada a um domínio Fc por meio de um ligante. Em determinadas modalidades, a proteína IL-15 é ligada a um domínio Fc diretamente, tal como sem um ligante. Em modalidades particulares, a proteína IL-15 é anexada a um domínio Fc por meio de uma região de dobradiça ou um fragmento da mesma. Em outras modalidades, a proteína IL-15Rα é ligada a um domínio Fc por meio de um ligante. Em outras modalidades, a proteína IL-15Rα é ligada a um domínio Fc diretamente, tal como sem um ligante. Em modalidades particulares, a proteína IL-15Rα é anexada a um domínio Fc por meio de uma região de dobradiça ou um fragmento da mesma. Opcionalmente, um ligante não é usado para fixar a

proteína IL-15 ou a proteína IL-15Rα ao domínio de Fc.

[00330] Em alguns exemplos, o ABD PD-1 é covalentemente fixado ao terminal N de um domínio de Fc por meio de um ligante, tal como um ligante de domínio. Em outras modalidades, o ABD PD-1 é ligado a um domínio Fc diretamente, tal como sem um ligante. Em modalidades particulares, o ABD PD-1 é anexado a um domínio Fc por meio de uma região de dobradiça ou um fragmento da mesma.

[00331] Em algumas modalidades, o ligante é um "ligante de domínio", usado para ligar quaisquer dois domínios, como delineado em conjunto no presente documento. O ligante peptídeo pode incluir predominantemente os seguintes resíduos de aminoácido: Gly, Ser, Ala ou Thr. O ligante peptídeo deve ser um comprimento que é adequado para ligar as duas moléculas de modo que assumam a conformação correta um em relação a outro de modo que possam reter a atividade desejada. Em uma modalidade, o ligante tem cerca de 1 a 50 aminoácidos de comprimento, de preferência, cerca de 1 a 30 aminoácidos de comprimento. Em uma modalidade, os ligantes de 1 a 20 aminoácidos de comprimento podem ser usados, em que cerca de 5 cerca de 10 aminoácidos são úteis para uso em algumas modalidades. Os ligantes úteis incluem polímeros de glicina-serina, que incluem, por exemplo, (GS)n (SEQ ID NO: XX), (GSGGS)n (SEQ ID NO: XX), (GGGGS)n (SEQ ID NO: XX) e (GGGS)n (SEQ ID NO: XX), em que n é um número inteiro de pelo menos um (e, de modo geral, de 3 a 4), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina e outros ligantes flexíveis. Alternativamente, uma variedade de polímeros não proteináceos, incluindo, porém sem limitação, polietilenoglicol (PEG), polipropilenoglicol, polioxialquilenos ou copolímeros de polietilenoglicol e polipropilenoglicol, podem ser úteis como ligantes, ou seja, podem ser úteis como ligantes.

[00332] Outras sequências de ligante podem incluir qualquer sequência de qualquer comprimento do domínio CL/CH1, porém nem todos os resíduos

do domínio CL/CH1; por exemplo, os primeiros 5 a 12 resíduos de aminoácido dos domínios CL/CH1. Os ligantes podem ser derivados da cadeia leve de imunoglobulina, por exemplo, Cκ ou Cλ. Os ligantes podem ser derivados de cadeias pesadas de imunoglobulina de qualquer isótipo, incluindo, por exemplo, Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cα1, Cα2, Cδ, Cε, e Cμ. As sequências de ligantes também podem ser derivadas de outras proteínas, tais como proteínas do tipo Ig (por exemplo, TCR, FcR, KIR), sequências derivadas da região de dobradiça e outras sequências naturais de outras proteínas.

[00333] Em algumas modalidades, o ligante scFv é um ligante scFv carregado, dos quais vários são mostrados na Figura 4A do documento nº US 62/353.511. Consequentemente, a presente invenção fornece adicionalmente ligantes scFv carregados, para facilitar a separação no pI entre um primeiro e um segundo monômeros (por exemplo, um monômero IL-15/IL-15Rα e ABD PD-1 monômero). Ou seja, incorporando-se um ligante scFv carregado, ou positivo ou negativo (ou ambos, no caso de arcabouços que usam scFvs em diferentes monômeros), isso permite que o monômero que compreende o ligante carregado para alterar o pI sem realizar mudanças adicionais nos domínios de Fc. Esses ligantes carregados podem ser substituídos em qualquer scFv quer contenha ligantes padrão. Novamente, como será observado pelas pessoas versadas na técnica, ligantes scFv carregados são usados na “fita” ou monômero correto de acordo com as mudanças desejadas no pI. Por exemplo, como discutido no presente documento, a fim de produzir o anticorpo heterodimérico de formato F triplo, o pI original da região Fv para cada um dos domínios de ligação a antígeno desejados são calculados, e um é escolhido para produzir um scFv, e dependendo do pI, ou ligantes positivos ou negativos são escolhidos.

[00334] Os ligantes de domínio carregados também podem ser usados para aumentar a separação de pI dos monômeros da invenção também, e então

aqueles incluídos na Figura 10 podem ser usados em qualquer modalidade no presente documento em que um ligante é utilizado.

IV. OS FORMATOS ÚTEIS DA INVENÇÃO

[00335] Como mostrado nas Figuras 28A-28H, há vários formatos úteis das proteínas de fusão Fc de IL-15/ IL-15Rα(sushi) direcionada a PD-1 da invenção. De modo geral, as proteínas de fusão heterodiméricas da invenção têm três componentes funcionais: um componente de IL-15/IL-15Rα(sushi), um componente anti-PD-1 e um componente Fc, dentre os quais cada um pode assumir diferentes formas, como delineado no presente documento e, dentre os quais, cada um pode ser combinado com os outros componentes em qualquer configuração.

[00336] Em qualquer um dos formatos abaixo, o primeiro e o segundo domínios Fc podem ter um conjunto de substituições de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em a) S267K/L368D/K370S : S267K/LS364K/E357Q; b) S364K/E357Q : L368D/K370S; c) L368D/K370S : S364K; d) L368E/K370S : S364K; e) T411T/E360E/Q362E : D401K; f) L368D/K370S : S364K/E357L e g) K370S : S364K/E357Q de acordo com a numeração EU.

[00337] Em algumas modalidades, o primeiro e/ou o segundo domínios Fc têm um conjunto adicional de substituições de aminoácidos que compreende Q295E/N384D/Q418E/N421D de acordo com a numeração EU.

[00338] Opcionalmente, o primeiro e/ou o segundo domínios de Fc têm um conjunto adicional de substituições de aminoácidos que consistem em G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G e E233P/L234V/L235A/G236del de acordo com a numeração EU.

[00339] Opcionalmente, o primeiro e/ou o segundo domínios Fc têm

variantes M428L/N434S para extensão de meia-vida. Em algumas modalidades, o primeiro e/ou o segundo domínios Fc têm variantes 428L/434S para extensão de meia-vida.

[00340] Assim, variantes particularmente úteis para qualquer um dos formatos abaixo têm o monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D (quando o monômero contém um domínio CH1) ou as variantes pI Q295E/N384D/Q418E/N421D (quando o monômero não contém domínio CH1).

A. SCIL-15/Rα X SCFV

[00341] Uma modalidade é mostrada na Figura 28A e compreende dois monômeros. Esse geralmente é denominado de "scIL-15/Rα X scFv", em que o "sc" significa "cadeia única" que se refere à fixação do domínio IL-15 e sushi com o uso de um ligante covalente. O formato "scIL-15/Rα x scFv" (consultar a Figura 28A) compreende IL-15Rα(sushi) fundida à IL-15 por um ligante de comprimento variável (denominado de "scIL-15/Rα") que é, em seguida, fundido ao terminal N de uma região Fc heterodimérica, com um scFv fundido ao outro lado do heterodimérico Fc.

[00342] No formato da Figura 28A, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO:

4), e o domínio Fv anti-PD-1 é selecionado a partir do grupo que consiste nas combinações de domínio mAbC VH e VL de H1.19_L1.140, H1_L1.1, H1.19_L1, H1.48_L1, H1.125_L1, H1.30_L1, H1.132_L1, H1_L1.1 H1_L1.3, H1_L1.45, H1_L1.117, H1_L1.129, H1.19_L1.1, H1.32_L1.1, H1.169_L1.1, H1.169_L1.1, H1.175_L1.1, H1.175_L1.1, H1_L1.140, H1_L1.135, H1_L1.136, H1.132_L1.135, H1.132_L1.140, H1.175_L1.135 e H1.175_L1.140.

[00343] No formato da Figura 28A, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: XX) e o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1.19_L1.140 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionada a partir de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00344] No formato da Figura 28A, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: XX) e o domínio Fv anti-PD-1 é selecionado a partir do grupo que consiste nas combinações de domínio VH e VL de H1_L1.1 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionada de N4D/N65D, D30N/N65D e

D30N/E64Q/N65D.

B. SCFV X NCIL-15/Rα

[00345] Essa modalidade é mostrada na Figura 28B e compreende três monômeros. Isso é geralmente denominado de “ncIL-15/Rα X scFv” ou “scFv X ncIL-15/Rα” em que o “nc” significa “não covalente” se referindo à fixação não covalente de automontagem do domínio IL-15 e sushi. O formato “scFv x ncIL-15/Rα” (consultar a Figura 34B) compreende um scFv fundido ao terminal N de uma região Fc heterodimérica, com IL-15Rα(sushi) fundida ao outro lado do heterodimérico Fc, ao passo que a IL-15 é submetida à transfecção separadamente de modo que um complexo IL-15/Rα não covalente seja formado.

[00346] No formato da Figura 28B, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1.19_L1.140 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionado de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00347] No formato da Figura 28B, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S

FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é selecionado a partir do grupo que consiste nas combinações de domínio VH e VL de H1_L1.1 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionada de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

C. SCIL-15/Rα X FAB

[00348] Esse formato preferencial é mostrado na Figura 28C e compreende três monômeros. Isso é denominado geralmente de "scIL-15/Rα X Fab" ou "Fab X scIL-15/Rα", como usado de modo intercambiável, em que o "sc" significa "cadeia única". O formato scIL-15/Rα x scFv (consultar a Figura 28C) compreende IL-15Rα(sushi) fundida à IL-15 por um ligante de comprimento variável (denominado de "scIL-15/Rα") que é, em seguida, fundido ao terminal N de uma região Fc heterodimérica (incluindo a dobradiça). O segundo monômero é uma cadeia pesada, VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3, enquanto uma cadeia leve correspondente (o terceiro monômero) é transfectada separadamente de modo a formar um Fab com o VH.

[00349] No formato da Figura 28C, algumas modalidades incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, as variantes 428L/434S FcRn e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e a variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 compreende um VH que compreende uma substituição de aminoácido F32L em comparação com SEQ ID NO: 5 e um VL que compreende as substituições de aminoácidos N27dH/K30Y/S93T em comparação com SEQ ID NO: 6.

[00350] No formato da Figura 28C, algumas modalidades incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4), o domínio Fv anti-PD-1 compreende um VH que compreende uma substituição de aminoácido F32L em comparação com SEQ ID NO: 5 e um VL que compreende as substituições de aminoácidos N27dH/K30Y/S93T em comparação com SEQ ID NO: 6, e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionada de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00351] No formato da Figura 28C, algumas modalidades incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, a variante FcRn 428L/434S e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e a variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1.19_L1.140 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionado de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00352] No formato da Figura 28C, algumas modalidades incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, a variante FcRn 428L/434S e o

monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e a variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1_L1.1 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionada a partir de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00353] No formato da Figura 28C, algumas modalidades incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1.19_L1.140 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionado de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00354] No formato da Figura 28C, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é selecionado a partir do grupo que consiste nas combinações de domínio VH e VL de H1_L1.1 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionada de N4D/N65D, D30N/N65D e

D30N/E64Q/N65D.

[00355] As sequências de aminoácidos da proteína de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 não competitiva ilustrativa do formato scIL-15/Rα x Fab (Figura 28C) são fornecidas nas Figuras 30, 48, 49 e 68.

[00356] Em algumas modalidades, o primeiro monômero compreende, do terminal N ao C, o domínio sushi-domínio ligante-IL-15 variante-domínio ligante-CH2-CH3, e o segundo monômero compreende uma cadeia pesada, VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3. O terceiro monômero é uma cadeia leve, VL-CL. As combinações preferenciais das variantes para essa modalidade são constatadas na Figura 7C do documento PCT/US2017/056826.

[00357] No formato scIL-15/Rα X Fab, uma modalidade preferencial utiliza o par de variante enviesada S364K/E357Q : L368D/K370S.

[00358] No formato scIL-15/Rα X scFv Fab, uma modalidade preferencial utiliza as variantes de enviesamento S364K/E357Q (no monômero scFv-Fc) e L368D/K370S (no monômero complexo IL-15), as variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D (no lado do complexo IL-15), as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236_/S267K em ambos os monômeros, e opcionalmente as variantes 428L/434S em ambos os lados.

D. NCIL-15/Rα X FAB

[00359] Essa modalidade é mostrada na Figura 28D e compreende três monômeros. Isso é geralmente denominado de “ncIL-15/Rα X scFv” ou “scFv X ncIL-15/Rα”, como usado de modo intercambiável, em que o “nc” significa “não covalente” se referindo à fixação não covalente de automontagem do domínio IL-15 e sushi. O formato “ncIL-15/Rα x Fab” (consultar a Figura 34D) compreende um VH fundido ao terminal N de uma região Fc heterodimérica, com IL-15Rα(sushi) fundida ao outro lado do heterodimérico Fc, ao passo que uma cadeia leve correspondente é submetida à transfecção separadamente de modo a formar um Fab com o VH, e ao passo que a IL-15 é submetida à transfecção separadamente de modo que um complexo IL-15/Rα

não covalente seja formado.

[00360] Em algumas modalidades, o primeiro monômero compreende, do terminal N ao C, o domínio sushi-domínio ligante-CH2-CH3, e o segundo monômero compreende uma cadeia pesada, VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3. O terceiro monômero é o domínio IL-15. No formato ncIL-15/Rα X Fab, uma modalidade preferencial utiliza o par de variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S.

[00361] No formato da Figura 28D, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1.19_L1.140 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionado de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00362] No formato da Figura 28D, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é selecionado a partir do grupo que consiste nas combinações de domínio VH e VL de H1_L1.1 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionada de N4D/N65D, D30N/N65D e

D30N/E64Q/N65D.

E. MAB-SCIL-15/Rα

[00363] Essa modalidade é mostrada na Figura 28E e compreende três monômeros (embora a proteína de fusão seja um tetrâmero). Isso é geralmente denominado de "Central-scIL-15/Rα", em que "sc" significa "cadeia única". O formato "mAb-scIL-15/Rα" (consultar a Figura 34E) compreende VH fundido ao terminal N de um primeiro e um segundo Fc heterodiméricos, em que a IL-15 é fundida à IL-15Rα(sushi) que é, em seguida, fundida adicionalmente ao terminal C de uma dentre a região Fc heterodimérica, ao passo que cadeias leves correspondentes são submetidas à transfecção separadamente de modo a formar um Fabs com os VHs.

[00364] O primeiro monômero compreende uma cadeia pesada, VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3. O segundo monômero compreende uma cadeia pesada com um complexo scIL-15, VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3-domínio ligante-domínio sushi-domínio ligante-IL-15. O terceiro (e quarto) monômero são cadeias leves, VL-CL. Isso é geralmente denominado de "Central-scIL-15/Rα", em que "sc" significa "cadeia única". No formato mAb-scIL-15/Rα, uma modalidade preferencial utiliza o par de variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S.

[00365] No formato da Figura 28E, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1.19_L1.140 e o domínio IL-15 compreende uma variante

selecionado de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00366] No formato da Figura 28E, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é selecionado a partir do grupo que consiste nas combinações de domínio VH e VL de H1_L1.1 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionada de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

F. MAB-NCIL-15/Rα

[00367] Essa modalidade é mostrada na Figura 28F e compreende quatro monômeros (embora a proteína de fusão heterodimérica seja um pentâmero). Isso é geralmente denominado de “mAb-ncIL-15/Rα”, em que o “nc” significa “não covalente”. O formato “mAb-ncIL-15/Rα” (Figura 34F) compreende VH fundido ao terminal N de um primeiro e um segundo Fc heterodimérico, com a IL-15Rα(sushi) fundida ao terminal C de uma dentre a região Fc heterodimérica, ao mesmo tempo que cadeias leves correspondentes são submetidas à transfecção separadamente de modo a formar um Fabs com os VHs, e ao mesmo tempo que a IL-15 é submetida à transfecção separadamente de modo que um complexo IL-15/Rα não covalente seja formado.

[00368] O primeiro monômero compreende uma cadeia pesada, VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3. O segundo monômero compreende uma cadeia pesada com um domínio IL-15Rα(sushi), VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3-domínio ligante-domínio sushi. O terceiro monômero é um domínio IL-15. O

quarto (e quinto) monômero são cadeias leves, VL-CL. No formato mAb-ncIL-15/Rα, uma modalidade preferencial utiliza o par de variantes de enviesamento S364K/E357Q : L368D/K370S.

[00369] No formato da Figura 28F, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1.19_L1.140 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionado de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00370] No formato da Figura 28F, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é selecionado a partir do grupo que consiste nas combinações de domínio VH e VL de H1_L1.1 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionada de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

G. CENTRAL-IL-15/Rα

[00371] Essa modalidade é mostrada na Figura 28G e compreende quatro monômeros que formam um tetrâmero. Isso é geralmente denominado

de “Central-IL-15/Rα”. O formato central-IL-15/Rα (consultar a Figura 28G) compreende um VH fundido de maneira recombinante ao terminal N da IL-15 que é, em seguida, fundido adicionalmente a um lado de um Fc heterodimérico e um VH fundido de maneira recombinante ao terminal N da IL-15Rα(sushi) que é, em seguida, fundida adicionalmente ao outro lado do Fc heterodimérico, ao mesmo tempo que cadeias leves correspondentes são submetidas à transfecção separadamente de modo a formar um Fabs com os VHs.

[00372] No formato da Figura 28G, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1.19_L1.140 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionado de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00373] No formato da Figura 28G, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é selecionado a partir do grupo que consiste nas combinações de domínio VH e VL de H1_L1.1 e o domínio

IL-15 compreende uma variante selecionada de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

H. SCIL-15/Rα CENTRAL

[00374] Essa modalidade é mostrada na Figura 28H e compreende quatro monômeros que formam um tetrâmero. Isso é geralmente denominado de "Central-scIL-15/Rα", em que "sc" significa "cadeia única". O formato central-scIL-15/Rα (consultar a Figura 34H) compreende um VH fundido ao terminal N de IL-15Rα(sushi) que é fundido a IL-15 que é, em seguida, fundido adicionalmente a um lado de um Fc heterodimérico e um VH fundido ao outro lado do Fc heterodimérico, ao passo que as cadeias leves correspondentes são submetidas à transfecção separadamente de modo a formar um Fabs com os VHs.

[00375] No formato da Figura 28H, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4) e o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1.19_L1.140 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionado de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

[00376] No formato da Figura 28H, alguns aspectos incluem um domínio Fc com um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q e as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes pI

N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e, opcionalmente, uma variante 428L/434S FcRn. Nessas modalidades, o domínio sushi é o tipo selvagem (SEQ ID NO: 4), e o domínio Fv anti-PD-1 é selecionado do grupo que consiste nas combinações de domínio VH e VL de H1.19_L1.140 e o domínio IL-15 compreende uma variante selecionada de N4D/N65D, D30N/N65D e D30N/E64Q/N65D.

I. FORMATOS ADICIONAIS

[00377] Como será apreciado por aqueles na técnica, existem formatos adicionais que encontram uso com os complexos de IL-15 e sequências Fv anti-PD-1 não concorrentes. Assim, por exemplo, a invenção fornece proteínas de fusão que compreendem um complexo IL-15 que compreende um domínio IL-15 (que pode ser de tipo selvagem ou uma variante), um ligante de domínio, uma sequência IL-15R (que pode ser toda ou parte do domínio extracelular e também pode incluir variantes) e um ABD anti-PD-1 não competitivo, seja como um Fab ou um scFv.

V. MODALIDADES ÚTEIS DA INVENÇÃO

[00378] São fornecidas no presente documento proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 com uma ou mais substituições de aminoácidos projetadas da proteína IL-15 e ABDs anti-PD-1 que não competem pela ligação com anti-PD-1 aprovados selecionados anticorpos. Em algumas modalidades, a variante IL-15 da proteína de fusão Fc tem substituições N4D/N65D. Em algumas modalidades, a variante de IL-15 da proteína de fusão Fc tem uma substituição D30N. Em algumas modalidades, a variante IL-15 da proteína de fusão Fc tem substituições D30N/E64Q/N65D. Em algumas modalidades, a variante IL-15 da proteína de fusão Fc tem substituições D30N/N65D. Essas proteínas de fusão contendo IL-15/Rα-Fc podem induzir ou promover a proliferação de células imunes, incluindo células NK, células T $CD8^+$ e células T $CD4^+$. Notavelmente, proteínas de fusão contendo IL-15/Rα-Fc que não têm nenhum ligante (por exemplo,

apenas região de dobradiça) no lado de IL-15 Fc demonstrou atividade proliferativa mais fraca.

[00379] São fornecidas no presente documento proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 com menor potência, farmacocinética aumentada e/ou meia-vida sérica aumentada. As proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 descritas no presente documento foram projetadas para diminuir sua potência em comparação com uma construção parental. Em algumas modalidades, uma ou mais substituições de aminoácidos foram introduzidas no complexo IL-15/Rα e/ou no domínio (ou domínios) Fc da proteína de fusão Fc heterodimérica. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 com potência reduzida em comparação com um construto de controle (por exemplo, um construto parental) têm uma metade semelhante ao soro substancialmente mais longa. Em certas modalidades, a meia-vida sérica aumentou em 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x, 25x ou mais.

[00380] São fornecidas neste documento proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 que aumentaram GVHD em um modelo animal (por exemplo, um camundongo NSG enxertado com PBMC humana) em comparação com a terapia de combinação de uma fusão scIL-15/Rα-Fc de controle proteína projetada para potência reduzida e um anticorpo anti-PD-1. A administração de uma proteína de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 não competitiva exemplificativa produziu um efeito maior em comparação com a combinação de bloqueio de IL-15 e PD-1.

[00381] As proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 descritas neste documento incluindo as proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 podem induzir fosforilação de STAT5 em células imunes incluindo, porém sem limitação, linfócitos ativados, células T ativadas (por exemplo, células T CD4+ ativadas e células CD8+ ativadas) e linfócitos infiltrantes de tumor ativados (por exemplo, TILs ativados).

[00382] Uma modalidade preferencial utiliza o formato da Figura 28C. Esta modalidade inclui: a) um domínio Fc com (i) um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e as variantes 428L/434S FcRn; b), e (ii) um monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, as variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e a variante FcRn 428L/434S; b) o domínio sushi é do tipo selvagem (SEQ ID NO: 4); c) o domínio Fv anti-PD-1 compreende um VH que compreende uma substituição de aminoácido F32L em comparação com a SEQ ID NO: 5 e um VL que compreende as substituições de aminoácido N27dH/K30Y/S93T em comparação com a SEQ ID NO: 6; e d) o domínio IL-15 é D30N/E64Q/N65D.

[00383] Uma modalidade preferencial adicional utiliza o formato da Figura 28C. Esta modalidade inclui: a) um domínio Fc com (i) um monômero positivo que compreende as variantes de enviesamento S364K/E357Q, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K e a variante FcRn 428L/434S; (ii) o monômero negativo que compreende as variantes de enviesamento L368D/K370S, as variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, as variantes pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D e a variante FcRn 428L/434S; b) o domínio sushi é do tipo selvagem (SEQ ID NO: 4); c) o domínio Fv anti-PD-1 é a combinação de domínios VH e VL de H1_L1.1 e d) o domínio IL-15 compreende D30N/E64Q/N65D.

[00384] Em algumas modalidades, as sequências particularmente úteis para as proteínas de fusão da invenção são baseadas nas sequências de estrutura principal da Figura 11 para o formato da Figura 34C. Essas são sequências para dois monômeros, o “lado do complexo IL-15” e o “lado Fab”, sem as sequências do complexo IL-15 nem o VH do Fab (as sequências da

região constante da cadeia leve estão na Figura 12).

[00385] Ou seja, a invenção fornece sequências da Estrutura 1 em combinação com uma sequência VH e VL da Figura 43.

VI. ÁCIDOS NUCLEICOS DA INVENÇÃO

[00386] A invenção fornece, adicionalmente, composições de ácido nucleico que codificam a proteína de fusão Fc heterodimérica da invenção (ou também, no caso de uma proteína de domínio Fc de monômero, ácidos nucleicos que codificam as mesmas).

[00387] Como será verificado por aqueles versados na técnica, as composições de ácido nucleico dependerão do formato da proteína heterodimérica de fusão Fc de IL-15/Rα. Assim, por exemplo, quando o formato necessita de três sequências de aminoácidos, três sequências de ácidos nucleicos podem ser incorporadas em um ou mais vetores de expressão para expressão. De modo similar, em alguns formatos apenas dois ácidos nucleicos são necessários; novamente, podem ser colocados em um ou dois vetores de expressão.

[00388] Como conhecido na técnica, os ácidos nucleicos que codificam os componentes da invenção podem ser incorporados em vetores de expressão, como conhecido na técnica, e dependendo das células hospedeiras usadas para produzir as proteínas de fusão Fc heterodiméricas da invenção. De modo geral, os ácidos nucleicos são operacionalmente ligados a diversos elementos reguladores (promotores, origem de replicação, marcadores selecionáveis, sítios de ligação ribossômica, indutores, etc.). Os vetores de expressão podem ser extracromossômicos ou vetores de integração.

[00389] Os vetores de expressão e/ou ácidos nucleicos da invenção são, então, transformados em diversos tipos diferentes de células hospedeiras, como bem conhecido na técnica, incluindo células mamíferas, bacterianas, de levedura, de inseto e/ou fúngicas, em que células mamíferas (por exemplo, células CHO) são úteis em diversas modalidades.

[00390] Em algumas modalidades, ácidos nucleicos que codificam cada monômero, como aplicável dependendo do formato, estão, cada um, contidos em um único vetor de expressão, geralmente sob controles de promotor diferentes ou iguais. Em modalidades de uso particular na presente invenção, cada um desses dois ou três ácidos nucleicos estão contidos em um diferente vetor de expressão.

[00391] A proteína de fusão Fc heterodimérica da invenção é produzida cultivando-se células hospedeiras que compreendem o vetor (ou vetores) de expressão como bem conhecido na técnica. Uma vez produzida, etapas de purificação de anticorpo ou proteína de fusão tradicionais são realizadas, que incluem uma etapa de cromatografia de troca iônica. Como discutido no presente documento, ter os pIs dos dois monômeros diferindo em pelo menos 0,5 pode permitir a separação por cromatografia de troca iônica ou foco isoelétrico, ou outros métodos sensíveis ao ponto isoelétrico. Isto é, a inclusão de substituições de pI que alteram o ponto isoelétrico (pI) de cada monômero de modo que cada monômero tenha um pI diferente e o heterodímero também tenha um pI distinto, assim facilitando a purificação isoelétrica do heterodímero (por exemplo, colunas de troca aniônica, colunas de troca catiônica). Essas substituições também auxiliam na determinação e no monitoramento de quaisquer homodímeros contaminantes pós-purificação (por exemplo, géis IEF, cIEF e colunas de IEX analíticos).

VII. FUNCIONALIDADE BIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE ANTICORPO DE PONTO DE VERIFICAÇÃO IMUNOLÓGICO BIESPECÍFICO X PROTEÍNAS DE FUSÃO IMUNOMODULADORAS HETERODIMÉRICAS IL-15/IL-15Rα

[00392] De modo geral, as proteínas de fusão Fc heterodiméricas da invenção são administradas a pacientes com câncer, e a eficácia é avaliada, de diversas maneiras, como descrito no presente documento. Desse modo, embora os ensaios padrão de eficácia possam ser realizados, tais como carga

de câncer, tamanho do tumor, avaliação da presença ou extensão da metástase, etc., os tratamentos de imuno-oncologia podem também ser avaliados com base nas avaliações do estado imunológico. Isso pode ser realizado de diversas maneiras, que incluem ensaios tanto in vitro quanto in vivo. Por exemplo, avaliação de alterações no estado imunológico (por exemplo, presença de células T ICOS+ CD4+ depois do tratamento ipi) juntamente com medidas "à moda antiga", tais como carga tumoral, tamanho, invasividade, envolvimento de LN, metástase, etc., pode ser realizada. Assim, qualquer um ou todos os seguintes podem ser avaliados: os efeitos inibidores de PVRIG em ativação ou proliferação de célula T $CD4^+$, ativação ou proliferação de célula T $CD8^+$ (CTL), atividade citotóxica mediada por célula T $CD8^+$ e/ou redução de célula mediada por CTL, atividade de célula NK e redução mediada por célula NK, os efeitos de potencialização das proteínas de fusão na diferenciação e proliferação de célula Treg e imunotolerância ou imunossupressão mediada por célula supressora derivada de mieloide ou Treg (MDSC), e/ou os efeitos das proteínas de fusão na produção de citocina pró-inflamatória por células imunológicas, por exemplo, produção de IL-2, IFN-ɣ ou TNF-α por células T ou outras células imunológicas.

[00393] Em algumas modalidades, a avaliação do tratamento é realizada avaliando-se a proliferação de célula imune, com o uso de, por exemplo, método de diluição CFSE, coloração intracelular Ki67 de células efetoras imunes e método de incorporação de ^{3}H-timidina.

[00394] Em algumas modalidades, a avaliação do tratamento é feita avaliando-se o aumento na expressão gênica ou os níveis aumentados de proteína de marcadores associados à ativação, incluindo um ou mais dentre: CD25, CD69, CD137, ICOS, PD1, GITR, OX40 e desgranulação celular medida por expressão de superfície de CD107A.

[00395] Em geral, os ensaios de expressão genética são realizados como conhecido na técnica.

[00396] Em geral, medidas de expressão de proteína também são realizadas de modo similar como conhecido na técnica.

[00397] Em algumas modalidades, a avaliação do tratamento é feita avaliando-se atividade citotóxica por detecção de viabilidade de célula-alvo por meio da estimação de inúmeros parâmetros celulares, tais como atividade enzimática (incluindo atividade de protease), permeabilidade em membrana celular, aderência celular, produção de ATP, produção coenzimática e atividade de captação de nucleotídeo. Os exemplos específicos desses ensaios incluem, porém sem limitação, marcação Trypan Blue ou PI, métodos de liberação ^{51}Cr ou ^{35}S, atividade de LDH, ensaios de MTT e/ou WST, ensaio Calcein-AM, ensaio com base luminescente e outros.

[00398] Em algumas modalidades, a avaliação de tratamento é realizada avaliando-se a atividade de célula T medida por produção de citocina, medição intracelularmente em cultura sobrenadante com o uso de citocinas que inclui, porém sem limitação, a IFNγ, TNFα, GM-CSF, IL2, IL6, IL4, IL5, IL10, IL13 com o uso de técnicas bem conhecidas.

[00399] Assim, a avaliação do tratamento pode ser feita com o uso de ensaios que avaliam um ou mais dentre o seguinte: (i) aumentos da resposta imunológica, (ii) aumentos na ativação de células T αβ e/ou γδ, (iii) aumentos de atividade de célula T citotóxica, (iv) aumentos em atividade de célula NK e/ou NKT, (v) alívio de supressão de células T αβ e/ou γδ, (vi) aumentos na secreção de citocinas pró-inflamatórias, (vii) aumentos na secreção de IL-2; (viii) aumentos na produção de interferon-ɣ, (ix) aumentos na resposta Th1, (x) diminuições na resposta de Th2, (xi) diminuições ou eliminação do número de células e/ou atividade de pelo menos uma dentre as células T reguladoras (Tregs).

A. ENSAIOS PARA MEDIR LIGAÇÃO COMPETITIVA

[00400] Em geral, os ensaios de binning de epítopo, como aqueles descritos no presente documento, bem como outros ensaios de inibição

competitiva, como são conhecidos na técnica, podem ser executados para determinar se o NCPD-1 Fv competirá pela ligação a PD-1 com anticorpos aprovados. O binning de epítopo é um processo que usa um imunoensaio competitivo para testar anticorpos em uma maneira combinatória de pares, e os anticorpos que competem pela mesma região de ligação, isto é, o mesmo epítopo ou um epítopo intimamente relacionado de um antígeno, são agrupados em compartimentos. Portanto, um anticorpo que armazena em um epítopo diferente do nivolumabe e/ou pembrolizumabe é considerado não competidor com o nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

[00401] Os anticorpos não competidores podem ser determinados por um ensaio no qual o anticorpo ou fragmento imunologicamente funcional a ser testado não previne ou inibe a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum. Normalmente, tal ensaio envolve o uso de antígeno purificado (por exemplo, PD-1 ou um domínio ou fragmento do mesmo) ligado a uma superfície sólida ou a células. A inibição competitiva é medida determinando a quantidade de um primeiro anticorpo ligado à superfície sólida ou às células na presença do segundo anticorpo. Normalmente, quando um anticorpo competidor está presente em excesso, ele inibirá a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum em pelo menos 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75%. Em alguns casos, a ligação é inibida em pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 97% ou mais. Por outro lado, quando o anticorpo de referência está ligado, ele inibirá preferencialmente a ligação de um anticorpo de teste adicionado subsequentemente (ou seja, um anticorpo PD-1) em pelo menos 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75%. Em alguns casos, a ligação do anticorpo de teste é inibida em pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 97% ou mais.

[00402] Geralmente binning ou ligação competitiva pode ser determinada usando várias técnicas reconhecidas na técnica, tais como, por

exemplo, imunoensaios, como western blots, radioimunoensaios, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), imunoensaios "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, reações de precipitina, difusão em gel reações de precipitina, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios imunorradiométricos, imunoensaios fluorescentes e imunoensaios de proteína A. Tais imunoensaios são rotineiros e bem conhecidos na técnica (consultar, Ausubel et al, eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Adicionalmente, podem ser utilizados ensaios de bloqueio cruzado (consultar, por exemplo, o documento WO 2003/48731; e Harlow et al. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane).

[00403] Outras tecnologias usadas para determinar a inibição competitiva (e, portanto, "bins (compartimentos)"), incluem: ressonância de plasmon de superfície usando, por exemplo, o sistema BIAcore™ 2000 (GE Healthcare); interferometria de biocamada usando, por exemplo, um ForteBio® Octet RED (ForteBio); ou matrizes de esferas de citometria de fluxo usando, por exemplo, um FACSCanto II (BD Biosciences) ou um ensaio de detecção multiplex LUMINEX™ (Luminex). Um método particular para determinar a ligação competitiva usando interferometria de camada biológica é fornecido nos Exemplos 2 e 7 no presente documento.

[00404] Luminex é uma plataforma de imunoensaio baseada em microesferas que permite o emparelhamento de anticorpos multiplexados em grande escala. O ensaio compara os padrões de ligação simultâneos de pares de anticorpos ao antígeno alvo. Um anticorpo do par (mAb de captura) é ligado a microesferas Luminex, em que cada mAb de captura é ligado a uma microesfera de uma cor diferente. O outro anticorpo (detector mAb) é ligado a um sinal fluorescente (por exemplo, ficoeritrina (PE)). O ensaio analisa a ligação simultânea (emparelhamento) de anticorpos a um antígeno e agrupa

anticorpos com perfis de emparelhamento semelhantes. Perfis semelhantes de um mAb detector e um mAb de captura indicam que os dois anticorpos se ligam aos mesmos epítopos ou epítopos intimamente relacionados. Em uma modalidade, os perfis de emparelhamento podem ser determinados usando coeficientes de correlação de Pearson para identificar os anticorpos que se correlacionam mais intimamente com qualquer anticorpo particular no painel de anticorpos que são testados. Em modalidades, um mAb de teste/detector será determinado como estando no mesmo compartimento que um mAb de referência/captura se o coeficiente de correlação de Pearson do par de anticorpos for pelo menos 0,9. Em outras modalidades, o coeficiente de correlação de Pearson é pelo menos 0,8, 0,85, 0,87 ou 0,89. Em outras modalidades, o coeficiente de correlação de Pearson é pelo menos 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99 ou 1. Outros métodos de análise dos dados obtidos a partir do ensaio Luminex são descritos na Pat. nº US 8.568.992. A capacidade do Luminex de analisar 100 tipos diferentes de microesferas (ou mais) fornece simultaneamente antígeno e/ou superfícies de anticorpo quase ilimitadas, resultando em melhor rendimento e resolução no perfil de epítopo de anticorpo em um ensaio de biossensor (Miller, et al., 2011, PMID : 21223970).

[00405] Similarmente, técnicas de binning que compreendem ressonância de plasmon de superfície são compatíveis com a presente invenção. Como utilizado no presente documento, “ressonância de plasmon de superfície” se refere a um fenômeno óptico que permite a análise de interações específicas em tempo real pela detecção de alterações nas concentrações de proteínas dentro de uma matriz biossensora. Usando equipamento comercialmente disponível, como o sistema BIAcore™ 2000, pode ser facilmente determinado se os anticorpos selecionados competem entre si pela ligação a um antígeno definido.

[00406] Em outras modalidades, uma técnica que pode ser usada para

determinar se um anticorpo de teste “compete” pela ligação com um anticorpo de referência é a “interferometria de biocamada”, uma técnica analítica óptica que analisa o padrão de interferência da luz branca refletida de duas superfícies: uma camada de proteína imobilizada em uma ponta do biossensor e uma camada de referência interna. Qualquer mudança no número de moléculas ligadas à ponta do biossensor causa uma mudança no padrão de interferência que pode ser medida em tempo real. Esses ensaios de interferometria de biocamada podem ser conduzidos usando uma máquina ForteBio® Octet RED como segue. Um anticorpo de referência (Ab1) é capturado em um chip de captura anticamundongo, uma alta concentração de anticorpo de não ligação é então usada para bloquear o chip e uma linha de base é coletada. A proteína alvo recombinante monomérica é então capturada pelo anticorpo específico (Ab1) e a ponta é mergulhada em um poço com o mesmo anticorpo (Ab1) como controle ou em um poço com um anticorpo de teste diferente (Ab2). Se nenhuma ligação adicional ocorrer, como determinado pela comparação dos níveis de ligação com o Ab1 de controle, então Ab1 e Ab2 são determinados como anticorpos “competidores”. Se a ligação adicional for observada com Ab2, então Ab1 e Ab2 são determinados para não competir um com o outro. Este processo pode ser expandido para rastrear grandes bibliotecas de anticorpos exclusivos usando uma linha completa de anticorpos em uma placa de 96 poços representando compartimentos exclusivos. Em modalidades, um anticorpo de teste irá competir com um anticorpo de referência se o anticorpo de referência inibir a ligação específica do anticorpo de teste a um antígeno comum em pelo menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75%. Em outras modalidades, a ligação é inibida em pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 97% ou mais.

B. ENSAIOS PARA MEDIR EFICÁCIA

[00407] Em algumas modalidades, a ativação de célula T é avaliada com o uso de um ensaio de Reação de Linfócito Misturado (MLR) como

conhecido na técnica. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00408] Em uma modalidade, o ensaio da via de sinalização mede aumentos ou diminuições na resposta imunológica, como medido, por exemplo, por fosforilação ou defosforilação de diferentes fatores ou medindo-se outas modificações após a tradução. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00409] Em uma modalidade, o ensaio da via de sinalização mede aumentos ou diminuições na ativação de células T αβ e/ou γδ, como medido, por exemplo, por secreção de citocinas ou por proliferação ou por mudanças na expressão da de marcadores de ativação como, por exemplo, CD25, CD69, CD137, CD107a, PD1, etc. Um aumento na atividade indica a atividade imunoestimulante. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00410] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições na atividade de células T citotóxicas, como medido, por exemplo, exterminando-se células-alvo como, por exemplo, células cancerosas ou por secreção de citocinas ou por proliferação ou por mudanças na expressão de marcadores de ativação como, por exemplo, CD25, CD69, CD137, CD107a, PD1, etc. Um aumento na atividade indica atividade imunoestimulante. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00411] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em atividade de célula NK e/ou NKT como medido, por exemplo, por eliminação direta de células-alvo como, por exemplo, células cancerígenas ou por secreção de citocina ou por alterações em expressão de marcadores de ativação como, por exemplo, CD107a, etc. Um

aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00412] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em supressão de célula T αβ e/ou γδ como medido, por exemplo, por secreção de citocina ou por proliferação ou por alterações em expressão de marcadores de ativação como, para um exemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00413] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em secreção de citocina pró-inflamatória como medido, por exemplo, por ELISA ou por Luminex ou por métodos à base de microesfera Multiplex ou por marcação intracelular e análise FACS ou por Alispot etc. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00414] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em secreção de IL-2 como medido, por exemplo, por ELISA ou por Luminex ou por métodos à base de microesfera Multiplex ou por marcação intracelular e análise FACS ou por Alispot etc. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00415] Em uma modalidade, o ensaio da via de sinalização mede aumentos ou diminuições na produção do interferon-ɣ, como medido, por exemplo, por ELISA ou por Luminex ou por métodos com base em microesfera Multiplex ou por coloração intracelular e análise por FACS ou por Alispot etc. Um aumento na atividade indica atividade imunoestimulante. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00416] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em resposta de Th1 como medido, por exemplo, por

secreção de citocina ou por alterações em expressão de marcadores de ativação. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00417] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em resposta de Th2 como medido, por exemplo, por secreção de citocina ou por alterações em expressão de marcadores de ativação. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00418] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em atividade e/ou número celular de pelo menos uma das células T reguladoras (Tregs), como medido, por exemplo, por citometria de fluxo ou por IHC. Uma diminuição em resposta indica atividade imunoestimuladora. Diminuições apropriadas são iguais àquelas para aumentos, delineadas abaixo.

[00419] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em números celulares de macrófagos M2, como medido, por exemplo, por citometria de fluxo ou por IHC. Uma diminuição em resposta indica atividade imunoestimuladora. Diminuições apropriadas são iguais àquelas para aumentos, delineadas abaixo.

[00420] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em atividade pró-tumorigênica de macrófago M2, como medido, por exemplo, por secreção de citocina ou por alterações em expressão de marcadores de ativação. Uma diminuição em resposta indica atividade imunoestimuladora. Diminuições apropriadas são iguais àquelas para aumentos, delineadas abaixo.

[00421] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em aumento de neutrófilos N2, como medido, por exemplo, por fluxo citometria ou por IHC. Uma diminuição em resposta indica atividade imunoestimuladora. Diminuições apropriadas são iguais

àquelas para aumentos, delineadas abaixo.

[00422] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em atividade pró-tumorigênica de neutrófilos N2, como medido, por exemplo, por secreção de citocina ou por alterações em expressão de marcadores de ativação. Uma diminuição em resposta indica atividade imunoestimuladora. Diminuições apropriadas são iguais àquelas para aumentos, delineadas abaixo.

[00423] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em inibição de ativação de célula T, como medido, por exemplo, por secreção de citocina ou por proliferação ou por alterações em expressão de marcadores de ativação como, para um exemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00424] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em inibição de ativação de CTL, como medido, por exemplo, por eliminação direta de células-alvo como, por exemplo, células cancerígenas ou por secreção de citocina ou por proliferação ou por alterações em expressão de marcadores de ativação como, por exemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00425] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em exaustão de célula T αβ e/ou γδ, como medido, por exemplo, por alterações em expressão de marcadores de ativação. Uma diminuição em resposta indica atividade imunoestimuladora. Diminuições apropriadas são iguais àquelas para aumentos, delineadas abaixo.

[00426] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em resposta de célula T αβ e/ou γδ como medido,

por exemplo, por secreção de citocina ou por proliferação ou por alterações em expressão de marcadores de ativação como, para um exemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00427] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em estímulo de respostas de memória de antígeno específico como medido, por exemplo, por secreção de citocina ou por proliferação ou por alterações em expressão de marcadores de ativação como, por exemplo, CD45RA, CCR7 etc. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00428] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em apoptose ou lise de células cancerígenas como medido, por exemplo, por ensaios de citotoxicidade, tais como, por exemplo, MTT, liberação de Cr, Calcine AM, ou por ensaios à base de citometria de fluxo como, por exemplo, diluição de CFSE ou marcação de iodeto de propídio, etc. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00429] Em uma modalidade, o ensaio de trajetória de sinalização mede aumentos ou diminuições no estímulo do efeito citotóxico ou citostático em células cancerosas, como medido, por exemplo, por ensaios de citotoxicidade, tais como, por exemplo, MTT, liberação de Cr, Calcina AM ou por ensaios com base em citometria de fluxo como, por exemplo, uma diluição de CFSE ou marcação com iodeto de propídio etc. Um aumento na atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00430] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em eliminação direta de células cancerígenas, como

medido, por exemplo, por ensaios de citotoxicidade, tais como, por exemplo, MTT, liberação de Cr, Calcine AM, ou por ensaios à base de citometria de fluxo como, por exemplo, diluição de CFSE ou marcação de iodeto de propídio etc. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00431] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em atividade de Th17, como medido, por exemplo, por secreção de citocina ou por proliferação ou por alterações em expressão de marcadores de ativação. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00432] Em uma modalidade, o ensaio de via de sinalização mede aumentos ou diminuições em indução de citotoxicidade dependente de complemento e/ou citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo, como medido, por exemplo, por ensaios de citotoxicidade, tais como, por exemplo, MTT, liberação de Cr, Calcine AM, ou por ensaios à base de citometria de fluxo como, por exemplo, diluição de CFSE ou marcação de iodeto de propídio etc. Um aumento em atividade indica atividade imunoestimuladora. Aumentos apropriados em atividade são delineados abaixo.

[00433] Em uma modalidade, a ativação de célula T é medida, por exemplo, por extermínio direto das células-alvo como, por exemplo, células cancerosas ou por secreção de citocina ou por proliferação ou por mudanças na expressão de marcadores de ativação como, por exemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Para células T, aumentos na proliferação, marcadores de superfície celular de ativação (por exemplo, CD25, CD69, CD137, PD1), citotoxicidade (capacidade para exterminar células-alvo) e produção de citocina (por exemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IFNγ, TNF-a, IL-10, IL-17A) indica modulação imunológica que é consistente com o extermínio de células

cancerosas.

[00434] Em uma modalidade, a ativação de célula NK é medida, por exemplo, por extermínio direto de células-alvo como, por exemplo, células cancerosas ou por secreção de citocina ou por mudança na expressão de marcadores de ativação como, por exemplo, CD107a etc. Para células NK, aumentos em proliferação, citotoxicidade (capacidade para exterminar células-alvo e para aumentar a expressão de CD107a, granzima e perforina), produção de citocina (por exemplo, IFNγ e TNF) e expressão de receptor de superfície celular (por exemplo, CD25) indica modulação imunológica que é consiste com extermínio aumentado de células cancerosas.

[00435] Em uma modalidade, a ativação de célula T γδ é medida, por exemplo, por secreção de citocina ou por proliferação ou por mudanças na expressão de marcadores de ativação.

[00436] Em uma modalidade, ativação de célula Th1 é medida, por exemplo, por secreção de citocina ou por alterações em expressão de marcadores de ativação.

[00437] Aumentos apropriados em atividade ou resposta (ou diminuições, como apropriado, como delineado acima), são aumentos de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 98 a 99% por cento sobre o sinal em uma amostra de referência ou em amostras de controle, por exemplo, amostras de teste que não contêm um anticorpo anti-PVRIG da invenção. De modo similar, aumentos de pelo menos uma, duas, três, quatro ou cinco vezes em comparação com amostras de referência ou controle mostram eficácia.

VIII. ANTICORPOS DE BLOQUEIO DE PONTO DE VERIFICAÇÃO

[00438] As proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção descritas no presente documento são combinadas com outros agentes terapêuticos, incluindo anticorpos de bloqueio de ponto de verificação, tais como, porém sem limitação, um inibidor de PD-1, um

inibidor de TIM3, um inibidor de CTLA4, um inibidor de PD-L1, um inibidor de TIGIT, um inibidor de LAG3 ou uma combinação dos mesmos.

[00439] Além dos anticorpos discutidos abaixo, a divulgação adicional é encontrada no documento USSN 62/784.334, incorporada a título de referência em sua totalidade e especificamente para a discussão de anticorpos de ponto de verificação para uso em combinação.

A. ANTICORPOS ANTI-PD1

[00440] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 descrita no presente documento pode ser administrada a um sujeito com câncer em combinação com um anticorpo de bloqueio de ponto de verificação, por exemplo, um anticorpo anti-PD-1 ou um anti-PD-L1 anticorpo.

[00441] Em muitos aspectos, o inibidor de PD-1 é um anticorpo anti-PD-1 escolhido daqueles que não competem pela ligação com as sequências Fv não competidoras anti-PD-1 descritas neste documento. De uso particular são aqueles anticorpos anti-PD-1 aprovados para uso em seres humanos nos EUA ou no exterior, incluindo, porém sem limitação, nivolumabe e pembrolizumabe.

[00442] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é nivolumabe. Nomes alternativos para nivolumabe incluem MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538 ou BMS-936558. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é nivolumabe (Número de registro CAS: 946414-94-4). O nivolumabe é um anticorpo monoclonal IgG4 totalmente humano que bloqueia especificamente o PD1. Nivolumabe (clone 5C4) e outros anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente a PD1 são divulgados nos documentos US 8.008.449 e WO2006/121168. Em uma modalidade, o inibidor de PD-1 é nivolumabe, e tendo uma sequência divulgada no presente documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou

superior à sequência especificada)

[00443] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é pembrolizumabe. Pembrolizumabe (também dito como lambrolizumabe, MK-3475, MK03475, SCH-900475 ou KEYTRUDA®; Merck) é um anticorpo monoclonal humanizado de IgG4 que se liga a PD-1. Pembrolizumabe e outros anticorpos anti-PD-1 humanizados são divulgados nos documentos Hamid, O. et al. (2013) New England Journal of Medicine 369 (2): 134-144, documentos US 8.354.509 e WO2009/114335.

[00444] Outros anticorpos anti-PD1 incluem AMP 514 (Amplimmune), entre outros, por exemplo, anticorpos anti-PD1 divulgados nos documentos US 8.609.089, US 2010028330 e/ou US 20120114649.

[00445] Em algumas modalidades, o inibidor de PD-1 é uma imunoadesina (por exemplo, uma imunoadesina que compreende uma porção de ligação extracelular ou PD-1 de PD-L1 ou PD-L2 fundida a uma região constante (por exemplo, uma região Fc de uma sequência de imunoglobulina)). Em algumas modalidades, o inibidor PD-1 é AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; por exemplo, divulgado nos documentos WO2010/027827 e WO2011/066342), é um receptor solúvel de fusão de PD-L2 Fc que bloqueia a interação entre PD-1 e B7-H1.

[00446] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-PD-1 podem ser usados em combinação com uma proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα x anti-PD1 da invenção. Existem vários anticorpos anti-PD-1 incluindo, porém sem limitação, dois anticorpos atualmente aprovados pela FDA, pembrolizumabe e nivolizumabe, bem como aqueles em testes clínicos atualmente, incluindo, porém sem limitação, tislelizumabe, Sym021, REGN2810 (desenvolvido por Rengeneron), JNJ-63723283 (desenvolvido por J e J), SHR-1210, pidilizumabe, AMP-224, MEDIo680, PDR001 e CT-001, bem como outros descritos em Liu et al., J. Hemat. & Oncol. (2017) 10: 136, os anticorpos aí expressamente incorporados a título de referência.

B. ANTICORPOS ANTI-TIM3

[00447] As proteínas de fusão heterodiméricas de IL-15/Rα X [NC]PD-1 da invenção também podem ser coadministradas com anticorpos anti-TIM-3. Moléculas de anticorpo anti-TIM-3 não limitantes exemplificativas são divulgadas no documento US 2015/0218274, publicado em 6 de agosto de 2015, intitulado “Antibody Molecules to TIM-3 and Uses That”, incorporado a título de referência na sua totalidade.

[00448] Existem vários anticorpos TIM-3 em desenvolvimento clínico, incluindo, porém sem limitação, MBG453, Sym023, BGB-A425 e TSR-022.

[00449] Em uma modalidade, a molécula de anticorpo anti-TIM-3 inclui pelo menos um ou dois domínios variáveis de cadeia pesada (opcionalmente incluindo uma região constante), pelo menos um ou dois domínios variáveis de cadeia leve (opcionalmente incluindo uma região constante), ou ambos, que compreende a sequência de aminoácidos de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; ou como descrito nas Tabelas 1 a 4 do documente US 2015/0218274; ou codificado pela sequência de nucleotídeos nas Tabelas 1 a 4; ou uma sequência substancialmente idêntica (por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica) a qualquer uma das sequências acima mencionadas. A molécula de anticorpo anti-TIM-3, opcionalmente, compreende uma sequência líder de uma cadeia pesada, uma cadeia leve ou ambas, como mostrado no documento US 2015/0218274; ou uma sequência substancialmente idêntica a esta.

[00450] Em ainda outra modalidade, a molécula de anticorpo anti-

TIM-3 inclui pelo menos uma, duas ou três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de uma região variável da cadeia pesada e/ou uma região variável da cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento, por exemplo, um anticorpo escolhido de qualquer um dentre ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; ou como descrito nas Tabelas 1 a 4 do documento US 2015/0218274; ou codificado pela sequência de nucleotídeos nas Tabelas 1 a 4; ou uma sequência substancialmente idêntica (por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica) a qualquer uma das sequências acima mencionadas.

[00451] Em ainda outra modalidade, a molécula de anticorpo anti-TIM-3 inclui pelo menos uma, duas ou três CDRs (ou coletivamente todas as CDRs) de uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos mostrada nas Tabelas 1 a 4 do documento US 2015/0218274, ou codificado por uma sequência de nucleotídeos mostrada nas Tabelas 1 a 4. Em uma modalidade, uma ou mais das CDRs (ou coletivamente todas as CDRs) têm uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais alterações, por exemplo, substituições ou deleções de aminoácidos, em relação à sequência de aminoácidos mostrada em Tabelas 1 a 4, ou codificado por uma sequência de nucleotídeos mostrada na Tabela 1 a 4.

[00452] Em ainda outra modalidade, a molécula de anticorpo anti-TIM-3 inclui pelo menos uma, duas ou três CDRs (ou coletivamente todas as CDRs) de uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos mostrada nas Tabelas 1 a 4 do documento US 2015/0218274,

ou codificado por uma sequência de nucleotídeos mostrada nas Tabelas 1 a 4. Em uma modalidade, uma ou mais das CDRs (ou coletivamente todas as CDRs) têm uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais alterações, por exemplo, substituições ou deleções de aminoácidos, em relação à sequência de aminoácidos mostrada em Tabelas 1 a 4, ou codificado por uma sequência de nucleotídeos mostrada nas Tabelas 1 a 4. Em certas modalidades, a molécula de anticorpo anti-TIM-3 inclui uma substituição em uma CDR de cadeia leve, por exemplo, uma ou mais substituições em uma CDR1, CDR2 e/ou CDR3 da cadeia leve.

[00453] Em outra modalidade, a molécula de anticorpo anti-TIM-3 inclui pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs (ou coletivamente todas as CDRs) de uma região variável de cadeia pesada e leve que compreende uma sequência de aminoácidos mostrada nas Tabelas 1 a 4 do documento US 2015/0218274, ou codificado por uma sequência de nucleotídeos mostrada nas Tabelas 1 a 4. Em uma modalidade, uma ou mais das CDRs (ou coletivamente todas as CDRs) têm uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais alterações, por exemplo, substituições ou deleções de aminoácidos, em relação à sequência de aminoácidos mostrada em Tabelas 1 a 4, ou codificado por uma sequência de nucleotídeos mostrada nas Tabelas 1 a 4.

C. ANTICORPOS ANTI-CTLA4

[00454] As proteínas de fusão heterodiméricas de IL-15/Rα X [NC]PD-1 da invenção também podem ser coadministradas com anticorpos anti-CTLA-4. Anticorpos anti-CTLA-4 adequados para uso em terapias de combinação, como descrito neste documento, incluem, porém sem limitação, um anticorpo ipilimumabe atualmente aprovado pela FDA e vários outros em desenvolvimento, incluindo CP-675,206 e AGEN-1884. Anticorpos anti-CTLA4 exemplificativos adicionais incluem tremelimumabe (anticorpo monoclonal IgG2 disponível junto à Pfizer, anteriormente conhecido como

ticilimumabe, CP-675,206); e dim (anticorpo CTLA-4, também conhecido como MDX-010, nº CAS 477202-00-9). Outros anticorpos anti-CTLA-4 exemplificativos são divulgados, por exemplo, na Pat. nº US 5.811.097.

[00455] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CTLA4 é ipilimumabe divulgado em, por exemplo, nos documentos US 5.811.097, US 7.605.238, WO00/32231 e WO97/20574, e tendo uma sequência divulgada no presente documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou superior à sequência especificada).

[00456] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CTLA4 é tremelimumabe divulgado nos documentos, por exemplo, US 6.682.736 e WO00/37504, e tendo uma sequência divulgada neste documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência de pelo menos 85%, 90%, 95% idêntico ou superior à sequência especificada).

D. ANTICORPOS ANTI-PD-L1

[00457] As proteínas de fusão heterodiméricas de IL-15/Rα X [NC]PD-1 da invenção também podem ser coadministradas com anticorpos anti-PD-L1. Moléculas de anticorpo anti-PD-L1 não limitantes exemplificativas são divulgadas no documento US 2016/0108123, publicado em 21 de abril de 2016, intitulado “Antibody Molecules to PD-L1 and Uses Thereof”, incorporado a título de referência em sua totalidade.

[00458] Em uma modalidade, a molécula de anticorpo anti-PD-L1 inclui pelo menos um ou dois domínios variáveis de cadeia pesada (opcionalmente incluindo uma região constante), pelo menos um ou dois domínios variáveis de cadeia leve (opcionalmente incluindo uma região constante), ou ambos, que compreende a sequência de aminoácidos de qualquer um dentre BAP058-hum01, BAP058-hum02, BAP058-hum03, BAP058-hum04, BAP058-hum05, BAP058-hum06, BAP058-hum07,

BAP058-hum08, BAP058-hum09, BAP058-hum10, BAP058-hum11, BAP058-hum12, BAP058-hum13, BAP058-hum14, BAP058-hum15, BAP058-hum16, BAP058-hum17, BAP058-Clone-K, BAP058-Clone-L, BAP058-Clone-M, BAP058-Clone-N ou BAP058-Clone-O; ou como descrito na Tabela 1 do documento US 2016/0108123, ou codificado pela sequência de nucleotídeos na Tabela 1; ou uma sequência substancialmente idêntica (por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica) a qualquer uma das sequências acima mencionadas.

[00459] Em ainda outra modalidade, a molécula de anticorpo anti-PD-L1 inclui pelo menos uma, duas ou três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de uma região variável da cadeia pesada e/ou uma região variável da cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento, por exemplo, um anticorpo escolhido de qualquer um dentre BAP058-hum01, BAP058-hum02, BAP058-hum03, BAP058-hum04, BAP058-hum05, BAP058-hum06, BAP058-hum07, BAP058-hum08, BAP058-hum09, BAP058-hum10, BAP058-hum11, BAP058-hum12, BAP058-hum13, BAP058-hum14, BAP058-hum15, BAP058-hum16, BAP058-hum17, BAP058-Clone-K, BAP058-Clone-L, BAP058-Clone-M, BAP058-Clone-N ou BAP058-Clone-O; ou como descrito na Tabela 1 do documento US 2016/0108123, ou codificado pela sequência de nucleotídeos na Tabela 1; ou uma sequência substancialmente idêntica (por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica) a qualquer uma das sequências acima mencionadas.

[00460] Em algumas modalidades, o inibidor de PD-L1 é uma molécula de anticorpo. Em algumas modalidades, o inibidor anti-PD-Ll é escolhido de YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, MDX-1105, atezolizumabe, durbalumabe, avelumabe ou BMS936559.

[00461] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é atezolizumabe. Atezolizumabe (também referido como MPDL3280A e

Atezo®; Roche) é um anticorpo monoclonal que se liga a PD-L1. Atezolizumabe e outros anticorpos anti-PD-L1 humanizados são divulgados no documento US 8.217.149, e tendo uma sequência divulgada neste documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência de pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou superior à sequência especificada).

[00462] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é avelumabe. Avelumabe (também referido como A09-246-2; Merck Serono) é um anticorpo monoclonal que se liga a PD-L1. Avelumabe e outros anticorpos anti-PD-L1 humanizados são divulgados nos documentos US 9.324.298 e WO2013/079174, e tendo uma sequência divulgada no presente documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência de pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou superior à sequência especificada).

[00463] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é durvalumabe. Durvalumabe (também conhecido como MEDI4736; AstraZeneca) é um anticorpo monoclonal que se liga a PD-L1. Durvalumabe e outros anticorpos anti-PD-L1 humanizados são divulgados no documento US 8.779.108 e tendo uma sequência divulgada no presente documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência de pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou superior à sequência especificada).

[00464] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é BMS-936559. BMS-936559 (também referido como MDX-1105; BMS) é um anticorpo monoclonal que se liga a PD-L1. BMS-936559 e outros anticorpos anti-PD-L1 humanizados são divulgados nos documentos US 7.943.743 e WO2007005874, e tendo uma sequência divulgada no presente documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência de pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou superior

à sequência especificada).

[00465] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-PD-L1 podem ser usados em combinação com uma proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα x anti-PD1 da invenção. Existem vários anticorpos anti-PD-L1, incluindo três anticorpos atualmente aprovados pela FDA, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, bem como aqueles em testes clínicos atualmente, incluindo, porém sem limitação, LY33000054 e CS1001, bem como outros descritos em Liu et al., J. Hemat. & Oncol. (2017) 10: 136, os anticorpos aí expressamente incorporados a título de referência.

[00466] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 descrita no presente documento pode ser usada em combinação com um inibidor de PD-L1 ou PD-L2 (por exemplo, um anticorpo anti-PD-L1).

E. ANTICORPOS ANTI-TIGIT

[00467] As proteínas de fusão heterodiméricas de IL-15/RαX [NC]PD-1 da invenção também podem ser coadministradas com anticorpos anti-TIGIT. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT é OMP-313M32. OMP-313M32 (OncoMed Pharmaceuticals) é um anticorpo monoclonal que se liga a TIGIT. OMP-313M32 e outros anticorpos anti-TIGIT humanizados são divulgados nos documentos US20160376365 e WO2016191643, e tendo uma sequência divulgada no presente documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência de pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou superior para a sequência especificada).

[00468] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT é BMS-986207. BMS-986207 (também referido como ONO-4686; Bristol-Myers Squibb) é um anticorpo monoclonal que se liga a TIGIT. BMS-986207 e outros anticorpos anti-TIGIT humanizados são divulgados nos documentos US20160176963 e WO2016106302, e tendo uma sequência divulgada no

presente documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência de pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou superior para a sequência especificada).

[00469] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT é MTIG7192. MTIG7192 (Genentech) é um anticorpo monoclonal que se liga a TIGIT. MTIG7192 e outros anticorpos anti-TIGIT humanizados são divulgados nos documentos US2017088613, WO2017053748 e WO2016011264, e tendo uma sequência divulgada no presente documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência de pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou superior à sequência especificada).

[00470] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-TIGIT podem ser usados em combinação com uma proteína Fc heterodimérica de IL-15/Rα x anti-PD1 da invenção. Existem vários anticorpos TIGIT em desenvolvimento clínico, BMS-986207, OMP-313M32 e MTIG7192A.

F. ANTICORPOS ANTI-LAG-3

[00471] As proteínas de fusão heterodiméricas de IL-15/Rα X [NC]PD-1 da invenção também podem ser coadministradas com anticorpos anti-LAG-3. Moléculas de anticorpo anti-LAG-3 não limitantes exemplificativas são divulgadas no documento US 2015/0259420 publicado em 17 de setembro de 2015, intitulado “Antibody Molecules to LAG-3 and Uses Thereof”, incorporado a título de referência na sua totalidade.

[00472] Em uma modalidade, a molécula de anticorpo anti-LAG-3 inclui pelo menos um ou dois domínios variáveis de cadeia pesada (opcionalmente incluindo uma região constante), pelo menos um ou dois domínios variáveis de cadeia leve (opcionalmente incluindo uma região constante), ou ambos, que compreende a sequência de aminoácidos de qualquer um dentre BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07,

BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050(Ser) (por exemplo, BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser, BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser ou BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clone-F, BAP050-Clone-G, BAP050-Clone-H, BAP050-Clone-I, ou BAP050-Clone-J; ou como descrito na Tabela 1 do documento US 2015/0259420, ou codificado pela sequência de nucleotídeos na Tabela 1; ou uma sequência substancialmente idêntica (por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica) a qualquer uma das sequências acima mencionadas.

[00473] Em ainda outra modalidade, a molécula de anticorpo anti-LAG-3 inclui pelo menos uma, duas ou três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de uma região variável da cadeia pesada e/ou uma região variável da cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento, por exemplo, um anticorpo escolhido de qualquer um dentre BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050 (Ser) (por exemplo, BAP050-hum01-Ser, BAP050-Ser, -hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10 -Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser,

BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser ou BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clone-F, BAP050-Clone-G, BAP050-Clone-H, BAP050-Clone-I ou BAP050-Clone-J; ou como descrito na Tabela 1 do documento US 2015/0259420, ou codificado pela sequência de nucleotídeos na Tabela 1; ou uma sequência substancialmente idêntica (por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica) a qualquer uma das sequências acima mencionadas.

[00474] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-LAG-3 é BMS-986016. BMS-986016 (também referido como BMS986016; Bristol-Myers Squibb) é um anticorpo monoclonal que se liga a LAG-3. BMS-986016 e outros anticorpos anti-LAG-3 humanizados são divulgados nos documentos US 2011/0150892, WO2010/019570 e WO2014/008218.

[00475] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-LAG3 é LAG525. LAG525 (também referido como IMP701; Novartis) é um anticorpo monoclonal que se liga a LAG3. LAG525 e outros anticorpos anti-LAG3 humanizados são divulgados nos documentos US 9.244.059 e WO2008132601, e tendo uma sequência divulgada no presente documento (ou uma sequência substancialmente idêntica ou semelhante a esta, por exemplo, uma sequência de pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou superior à sequência especificada).

[00476] Outros exemplos de anticorpos anti-LAG-3 são divulgados, por exemplo, nos documentos US2011150892 e US2018066054.

[00477] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-LAG-3 podem ser usados em combinação com uma proteína de fusão heterodimérica bifuncional de IL-15/Rα x anti-PD1 da invenção. Existem vários anticorpos anti-LAG-3 em desenvolvimento clínico, incluindo REGN3767, da Regeneron e TSR-033 (Tesaro).

IX. TRATAMENTOS

[00478] Uma vez produzidas, as composições da invenção são úteis em diversas aplicações de oncologia, tratando-se câncer, geralmente promovendo-se ativação de célula T (por exemplo, células T não são mais suprimidas) com a ligação das proteínas de fusão Fc heterodiméricas da invenção.

[00479] Consequentemente, as composições heterodiméricas da invenção são úteis no tratamento desses cânceres.

A. ADMINISTRAÇÃO

[00480] Neste contexto, a administração "em combinação", tal como utilizado no presente documento, significa que os dois tratamentos são administrados ao sujeito durante o curso da aflição do sujeito com o distúrbio, por exemplo, os dois ou mais tratamentos são administrados após o sujeito ter sido diagnosticado com o distúrbio e antes que o distúrbio tenha sido curado ou eliminado ou o tratamento tenha terminado por outras razões. Em algumas modalidades, a entrega de um tratamento ainda está ocorrendo quando a entrega do segundo começa, de modo que há sobreposição em termos de administração. Isso às vezes é dito neste documento como "simultâneo" ou "entrega simultânea". Em outras modalidades, a administração de um tratamento termina antes do início da administração do outro tratamento. Em algumas modalidades de ambos os casos, o tratamento é mais eficaz por causa da administração combinada. Por exemplo, o segundo tratamento é mais eficaz, por exemplo, um efeito equivalente é visto com menos do segundo tratamento, ou o segundo tratamento reduz os sintomas em maior extensão, do que seria visto se o segundo tratamento fosse administrado na ausência do primeiro tratamento, ou situação análoga é observada com o primeiro tratamento. Em algumas modalidades, a entrega é tal que a redução em um sintoma, ou outro parâmetro relacionado ao distúrbio é maior do que o que seria observado com um tratamento administrado na ausência do outro. O efeito dos dois tratamentos pode ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo

ou maior do que o aditivo. A entrega pode ser tal que um efeito do primeiro tratamento administrado ainda seja detectável quando o segundo é administrado.

B. FORMULAÇÕES PARA ADMINISTRAÇÃO IN VIVO

[00481] Formulações dos anticorpos usados em conformidade com a presente invenção são preparadas para armazenamento misturando-se um anticorpo que tem o grau de pureza desejado com carreadores, excipientes ou estabilizadores farmaceuticamente aceitáveis opcionais (como geralmente delineado em Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edição, Osol, A. Ed. [1980]), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Modalidades Administrativas

[00482] As proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 divulgadas no presente documento e agentes quimioterapêuticos da invenção são administrados a um indivíduo, em conformidade com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa como um bolo ou por infusão contínua durante um período de tempo.

[00483] Todas as referências citadas estão expressamente incorporadas no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00484] Embora modalidades particulares da invenção tenham sido descritas acima para fins de ilustração, será verificado por aqueles versados na técnica que diversas variações dos detalhes podem ser realizadas sem que se afaste da invenção, como descrito nas reivindicações anexas.

X. EXEMPLOS

[00485] Exemplos são fornecidos abaixo para ilustrar a presente invenção. Esses exemplos não devem limitar a presente invenção em nenhuma aplicação particular ou teoria de operação. Para todas as posições de região constante abordadas na presente invenção, a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Serviço de Saúde Pública dos Estados

Unidos, Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, incorporado em sua totalidade a título de referência). Aqueles versados na técnica de anticorpos verificarão que essa convenção consiste em numeração não sequencial em regiões específicas de uma sequência de imunoglobulina, que permite uma referência normalizada pra posições conservadas em famílias de imunoglobulina. Consequentemente, as posições de qualquer dada imunoglobulina, como definido pelo índice EU não corresponderá necessariamente a sua sequência sequencial.

[00486] Técnicas científicas específicas e gerais são delineadas em nas Publicações nº 2015/0307629, 2014/0288275 e WO2014/145806, dentre as quais todas são incorporadas expressamente a título de referência em sua totalidade e particularmente para as técnicas delineadas nas mesmas. Os Exemplos 1 e 2 do documento de Número de Série US 62.416.087, depositado em 1 de novembro 2016, são incorporados expressamente a título de referência em sua totalidade, incluindo as figuras correspondentes.

A. EXEMPLO 1: IL-15/Rα-FC

1. MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO DE IL-15/Rα-FC

[00487] De modo a abordar a meia-vida curta de heterodímeros de IL-15/IL-15Rα, foi gerado o complexo de IL-15/IL-15Rα(sushi) como uma fusão Fc (denominado no presente documento proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc) com o objetivo de facilitar a produção e promoção de reciclagem mediada por FcRn do complexo e prolongar a meia-vida.

[00488] Plasmídeos que codificam para domínio IL-15 ou IL-15Rα sushi foram construídos por síntese de gene padrão, seguida por subclonagem em um vetor de expressão pTT5 que contém parceiros de fusão Fc (por exemplo, regiões constantes como retratadas nas Figuras 10). Esquemas em desenho de formatos de proteína de fusão de IL-15/Rα-Fc ilustrativos são retratados nas Figuras 13A a 13G.

[00489] Uma proteína ilustrativa do formato bivalente IL-15/Rα-Fc

(Figura 13A) é XENP20818, cujas sequências são retratadas na Figura 14, com sequências para proteínas adicionais desse formato. Uma proteína ilustrativa do formato scIL-15/Rα-Fc (Figura 13B) é XENP21478, sequências para as quais são retratadas na Figura 15. Uma proteína ilustrativa do formato ncIL-15/Rα-Fc (Figura 13C) é XENP21479, sequências para as quais são retratadas na Figura 16.

[00490] As proteínas foram produzidas por transfecção transitória em células HEK293E e foram purificadas por um processo de purificação de duas etapas que compreende cromatografia de proteína A e cromatografia de troca iônica.

[00491] Proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc ilustrativas no formato scIL-15/Rα-Fc (XENP21478) e no formato ncIL-15/Rα-Fc (XENP21479) foram testadas em um ensaio de proliferação celular. PBMCs humanas foram tratadas com os artigos de teste nas concentrações indicadas. 4 dias após o tratamento, as PBMCs foram coradas com anti-CD8-FITC (RPA-T8), anti-CD4-PerCP/Cy5.5 (OKT4), anti-CD27-PE (M-T271), anti-CD56-BV421 (5.1H11), anti-CD16-BV421 (3G8) e anti-CD45RA-BV605 (Hi100) para bloquear os seguintes tipos de célula: células T CD4+, células T CD8+ e células NK (CD56+/CD16+). Ki67 é uma proteína estritamente associada à proliferação celular, e marcação para Ki67 intracelular foi realizada com o uso de anti-Ki67-APC (Ki-67) e Foxp3/Conjunto de Tampão de Coloração de Fator de Transcrição (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass.). A porcentagem de Ki67 nos tipos celulares acima foi medida com o uso de FACS (retratados nas Figuras 17A-C). Os dados mostram que as proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc induziram forte proliferação de células T CD8+ e células NK.

2. PROTEÍNAS DE FUSÃO DE IL-15/Rα-FC VARIANTES MODIFICADAS PARA POTÊNCIA DIMINUÍDA

[00492] De modo a melhorar mais PK e prolongar meia-vida, foi

pensado que diminuir a potência de fusões de IL-15/Rα-Fc diminuiria o afundamento de antígeno e, assim, aumentaria a meia-vida. Examinando-se a estrutura cristalina das IL-15:IL-2Rß e IL-15:interfaces de cadeia gama comum, assim como modelando-se com o uso de software MOE, foram previstos resíduos nessas interfaces que podem ser substituídos de modo a reduzir a potência. A Figura 18 retrata um modelo estrutural dos complexos de IL-15:receptor que mostra localizações dos resíduos previstos em que foram modificadas as substituições isostéricas (de modo a reduzir o risco de imunogenicidade). Sequências para variantes de IL-15 ilustrativas modificadas para potência reduzida são retratadas na Figura 19.

[00493] A codificação de plasmídeos para IL-15 ou IL-15Rα(sushi) foi construída por síntese de gene padrão, em seguida de subclonagem em um vetor de expressão pTT5 que contém parceiros de fusão Fc (por exemplo, regiões constantes, como retratado na Figura 10). Substituições identificadas como descrito acima foram incorporadas por técnicas de mutagênese padrão. Proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc ilustrativas do formato "scIL-15/Rα-Fc" projetadas para potência reduzida incluem XENP29281, XENP24050, XENP29284, XENP29285, XENP29286, sequências para as quais são retratadas na Figura 21. As proteínas foram produzidas e purificadas como geralmente descrito no Exemplo 1A.

A. ATIVIDADE IN VITRO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO DE SCIL-15/Rα-FC QUE COMPREENDE VARIANTES DE IL-15 PROJETADAS PARA DIMINUIR A POTÊNCIA

[00494] Proteínas de fusão de scIL-15/Rα-Fc ilustrativas que compreendem variantes de IL-15 foram testadas em ensaios de proliferação celular. PBMCs humanas foram incubadas com os artigos de teste indicados nas concentrações indicadas por 3 dias. Após a incubação, as PBMCs foram coradas com anti-CD3-PE (OKT3), anti-CD4-FITC (RPA-T4), anti-CD8-eF660 (SIDI8BEE), anti-CD16-BV421 (3G8), anti-CD45RA-APC/Fire750

(HI100), anti-CD56-BV605 (5.1H11) e anti-Ki67-PE/Cy7 (Ki-67) e analisados por citometria de fluxo. A Figura 22 retrata a porcentagem de populações de células T CD4 e CD8 que expressam Ki67 indicativo de proliferação.

[00495] Os dados mostram que várias das fusões de scIL-15/Rα-Fc ilustrativas que compreendem variantes de IL-15 projetadas com o objetivo de reduzir a potência demonstraram potência reduzida em relação às fusões de scIL-15/Rα-Fc que compreendem WT IL-15. Notavelmente, os dados mostram que as fusões de scIL-15/Rα-Fc que compreende a variante IL-15(D30N/E64Q/N65D) não tiveram atividade ou reduziram drasticamente a atividade na proliferação de várias populações de linfócitos no contexto de fusões de scIL-15/Rα-Fc, em comparação com as fusões de scIL-15/Rα-Fc que compreendem as variantes IL-15(N4D/N65D) ou IL-15(D30N/N65D). Por outro lado, a fusão de scIL-15/Rα-Fc que compreende a variante de IL-15(D30N) teve pouca ou nenhuma redução na potência em relação à fusão de scIL-15/Rα-Fc que compreende WT IL-15.

B. EXEMPLO 2: BRAÇO DIRECIONADO A PD-1

[00496] Como descrito acima, a expressão de PD-1 é regulada positivamente em linfócitos infiltrantes de tumor ativados. Consequentemente, direcionar as proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc da invenção para linfócitos que expressam PD-1 poderia ser uma abordagem útil para direcionar as fusões IL-15/Rα-Fc para o ambiente do tumor e evitar a toxicidade sistêmica. Além disso, como seria útil combinar as proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas da invenção com anticorpos de bloqueio PD-1, ou administrar proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas da invenção subsequente ao tratamento com PD -1 de anticorpos de bloqueio, é importante que o braço direcionado a PD-1 da proteína de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada não se ligue ao mesmo epítopo ou epítopo semelhante ao anticorpo de bloqueio de PD-1. Os anticorpos de bloqueio de PD-1

contemplados neste documento incluem, porém sem limitação, nivolumabe e pembrolizumabe.

[00497] Sequências para vários mAbs anti-PD-1 cujas regiões variáveis são contempladas para uso neste documento são retratadas nas Figuras 25 a 26. Para investigar se os domínios de ligação anti-PD-1 descritos acima competiam com nivolumabe e pembrolizumabe, realizamos binning de epítopos em tandem nos mAbs quiméricos. O binning de epítopos em tandem foi realizado usando o instrumento Octet HTX. Os biossensores HIS1K foram usados primeiro para capturar PD-1-His seguido por imersão em 100 nM de um primeiro anticorpo e, em seguida, imersão em 100 nM de um segundo anticorpo. Os anticorpos testados foram XENP16432 (um mAb anti-PD-1 bivalente com base em nivolumabe; sequência retratada na Figura 24A), XENP21461 (pembrolizumabe; sequência retratada na Figura 24B, mAb A quimérico, mAb B quimérico e um mAb baseado em 1C11. PD-L1-Fc também foi incluído para investigar o bloqueio da interação PD-1: PD-L1 pelos anticorpos. As respostas BLI foram normalizadas contra a resposta BLI de imersão do biossensor em tampão HBS-EP seguido de imersão nos anticorpos anti-PD-1. Se o par de anticorpos forneceu uma resposta BLI normalizada inferior a 0,5, o par foi considerado competidor ou parcialmente competidor e estar no mesmo compartimento de epítopos, isto é, reconhecendo epítopos muito semelhantes ou amplamente sobrepostos. Se o par de anticorpos forneceu uma resposta BLI normalizada maior do que 0,5, o par foi considerado não competidor e deve ser dividido em diferentes epítopos. A resposta BLI normalizada para cada um dos pares de anticorpos está resumida na Figura 27.

[00498] O binning mostra que o mAb A e o mAb B anti-PD-1 não competem com o nivolumabe ou pembrolizumabe, enquanto o mAb baseado em 1C11 competiu com o nivolumabe e o pembrolizumabe. Além disso, o mAb A não parece bloquear a interação PD-1:PD-L1, enquanto o mAb B

bloqueia a interação PD-1:PD-L1.

[00499] Para facilidade, os domínios de ligação PD-1 que competem com nivolumabe e/ou pembrolizumabe são referidos no presente documento como anti-PD-1[C], e os domínios de ligação PD-1 que não competem com nivolumabe e/ou pembrolizumabe são referidos como anti-PD-1 [NC].

C. EXEMPLO 3: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1

[00500] Aqui, descreve-se a geração e caracterização de fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1, coletivamente referidas neste documento como fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1.

1. GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE FUSÕES IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1

[00501] Plasmídeos codificando para domínio sushi IL-15, IL-15Rα ou as regiões variáveis anti-PD-1 foram construídos por síntese de gene padrão, seguida por subclonagem em um vetor de expressão pTT5 que contém parceiro de fusão Fc (por exemplo, regiões constantes, como retratado na Figura 11). Os desenhos esquemáticos das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 ilustrativas são retratados na Figura 28.

[00502] Um formato ilustrativo particular, o formato “scIL-15/Rα x Fab” (Figura 28C), compreende IL-15Rα(sushi) fundida à IL-15 por um ligante de comprimento variável (denominado “scIL-15/Rα”) que é, em seguida, fundido ao terminal N de uma região Fc heterodimérica, com uma cadeia pesada variável (VH) fundida ao outro lado do heterodimérico Fc, ao mesmo tempo que uma cadeia leve correspondente é submetida à transfecção separadamente de modo a formar um Fab com o VH.

[00503] Gerou-se fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 neste formato com braços de direcionamento anti-PD-1[C] e braços de direcionamento anti-PD-1[NC]. As fusões que compreende braços de direcionamento anti-PD-1[C] são referidas no presente documento como fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a [C]PD-1, enquanto as fusões que

compreendem braços direcionados a anti-PD-1[NC] são referidas no presente documento fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1.

[00504] Como descrito no Exemplo 1B(a), as fusões de scIL-15/Rα-Fc que compreendem a variante de potência de IL-I5(D30N/D64N/N65D) eram quase completamente inativas na proliferação de várias populações de linfócitos. Por conseguinte, geramos fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 protótipo (ambos [C] e [NC]) com a variante de IL-15(N4D/N65D). As fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas ao [C]PD-1 protótipo foram geradas usando as regiões variáveis de 1C11 humanizado, e as fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 protótipo foram geradas usando as regiões variáveis de mAb A e mAb B humanizado. As sequências para uma proteína de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [C]PD-1 ilustrativa como tal estão retratadas na Figura 29; e as sequências para proteínas de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 ilustrativas como tal são retratadas na Figura 30. As fusões ilustrativas de XENP25850 de proteína de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [C]PD-1 e fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 também foram geradas com Xtend Fc (M428L/N434S). Gerou-se também um XENP26007 de proteína de fusão de controle de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV, sequências para as quais estão retratadas na Figura 31.

[00505] As proteínas foram produzidas por transfecção transitória em células HEK293E e foram purificadas por um processo de purificação de duas etapas que compreende cromatografia de proteína A e cromatografia de troca iônica.

2. 3B: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1 SÃO ATIVAS IN VITRO

[00506] Em um primeiro experimento investigando a atividade da fusão IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1, PBMCs humanas foram estimuladas por 48 horas com 100 ng/ml de anti-CD3 ligado à placa (OKT3), então marcado com CFSE e incubado com os artigos de teste indicados por 4 dias a

37 ºC. A proliferação de células T $CD8^+$ e $CD4^+$ foi medida por diluição CFSE e o corante Zombie foi usado para excluir células mortas. Dados que descrevem a porcentagem de proliferação de células T $CD8^+$ e as células T $CD4^+$ são retratadas na Figura 32.

[00507] Os dados mostram que cada uma das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 (ambas as versões [C] e [NC]) são ativas na proliferação de células T $CD8^+$ e $CD4^+$. Além disso, a fusão de controle de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV também foi ativa em células T em proliferação, enquanto o mAb anti-PD-1 XENP28519 sozinho não foi.

3. FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1 SÃO SELETIVAS PARA LINFÓCITOS ATIVADOS

[00508] Após a ligação das citocinas aos seus receptores, Janus quinases (JAKs) associadas aos receptores fosforilam as proteínas STAT que então se deslocam para o núcleo para regular outros processos a jusante. Portanto, a fosforilação de proteínas STAT (em particular, STAT5, que inclui STAT5a e STAT5b) é um dos primeiros eventos de sinalização desencadeados pela ligação de IL-15 aos seus receptores. Consequentemente, a capacidade das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 para induzir fosforilação de STAT5 em vários tipos de células foi investigada.

[00509] Para este experimento, foram usadas PBMCs frescas e ativadas. PBMCs ativadas, usadas como substitutos para linfócitos ativados no ambiente tumoral com expressão de PD-1 regulada de modo crescente, foram preparadas estimulando-se PBMCs frescas com 100 ng/ml de anti-CD3 ligado a placa (OKT3) por 2 dias. PBMCs frescas e ativadas foram incubadas com XENP25850 nas concentrações indicadas por 15 minutos a 37 ºC. Para bloquear várias populações de células após a incubação, PBMCs foram corados com anti-CD3-BUV395 (UCHT1), anti-CD4-BV605 (RPA-T4) e anti-CD8-Alexa700 (SK1) por 30 a 45 minutos em temperatura ambiente. Células foram lavadas e incubadas com 90% de metanol preaquecido (-20 ºC)

por 20 a 60 minutos. Após a incubação com metanol, as células foram lavadas novamente e coradas com anti-CD25-BV421 (M-A251), anti-CD45RA-BV510 (HI100) e anti-pSTAT5-Alexa647 (pY687) para marcar várias populações de células e fosforilação de STAT5. Os dados que retratam a indução da fosforilação de STAT5 em várias populações de células T $CD8^+$ e $CD4^+$ são retratados na Figura 33. Notavelmente, os dados mostram que o XENP25850 de proteína de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 demonstrou efeito aumentado em células T de PBMCs ativadas, enquanto mantém efeito mínimo em células T de PBMCs frescas. Isso sugere que, em um cenário clínico, as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 serão seletivas para linfócitos infiltrantes de tumor ativados no ambiente tumoral.

D. EXEMPLO 4: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 COMBINAM COM BLOQUEIO DE PD-1

1. O BLOQUEIO DE PD-1 NÃO INTERFERE COM A ATIVIDADE DE FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 IN VITRO

[00510] PBMCs frescas foram estimuladas com 100 ng/ml de anti-CD3 ligado a placa (OKT3) por 2 dias. PBMCs ativadas foram pré-incubadas por 30 minutos com 100 µg/ml de XENP16432, pembrolizumabe ou XENP15074 (mAb anti-RSV como controle). Após a pré-incubação, as PBMCs foram incubadas com os artigos de teste indicados nas concentrações indicadas por 15 minutos a 37 ºC. Para bloquear várias populações de células após a incubação, PBMCs foram primeiro coradas com anticorpos anti-CD3-BUV395 (UCHT1), anti-CD4-BV605 (RPA-T4), anti-CD25-BV421 (M-A251) e anti-CD45RA-BV510 (HI100). Após a primeira coloração, as células foram permeabilizadas usando PerFix EXPOSE (Beckman Coulter, Indianapolis, Ind.). Após a permeabilização, as células foram coradas com anti-CD8-PerCP/Cy5.5 (RPA-T8), anti-pSTAT5-AF647 e anti-PD-1-APC-Fire750 (EH12.2H7). Após a segunda coloração, as células foram analisadas por citometria de fluxo para investigar a fosforilação de STAT5 em células T

CD8+CD45RA-CD25+PD-1+ (como retratado na Figura 34) e CD4+CD45RA-CD25+PD-1+ (dados não mostrados).

[00511] Os dados mostram que a pré-incubação de PBMCs com XENP16432 ou pembrolizumabe reduziu a ativação de células T pela fusão XENP25937 de IL-15/Rα-Fc direcionada a [C]PD-1 em comparação com quando PBMCs foram pré-incubadas com anti-RSV mAb XENP15074, indicando, como esperado, que os mAbs anti-PD-1 impediram a ligação da fusão XENP25937 de IL-15/Rα-Fc direcionada a [C]PD-1 a células T. Por outro lado, a pré-incubação de PBMCs com XENP16432 ou pembrolizumabe não afetou a ativação de células T pela fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 XENP28523 em comparação a quando PBMCs foram pré-incubadas com mAb anti-RSV XENP15074. Isso sugere que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 poderiam ser empilhadas com mAbs anti-PD-1 sem efeito negativo.

2. FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 COMBINAM-SE SINERGICAMENTE COM O BLOQUEIO DE PD-1 IN VIVO

[00512] As fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 foram avaliadas em um modelo de doença de enxerto contra hospedeiro (GVHD) conduzido em camundongos imunodeficientes NSG (NOD-SCID-gama). Quando os camundongos de NSG são injetados com PBMCs humanas, as PBMCs humanas desenvolvem uma autorresposta imunológica contra células de camundongo. Como tal, GVHD é um modelo para resposta antitumoral. O tratamento de camundongos NSG enxertados com huPBMC com fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 deve aumentar a proliferação das células T enxertadas e aumentar GVHD.

[00513] Em um primeiro estudo de GVHD, camundongos NSG foram enxertados com 10 x 10^6 PBMCs humanas por meio de IV-OSP no Dia -1 e dosados intraperitonealmente com os artigos de teste indicados nas concentrações indicadas nos Dias 0, 7, 14 e 21. Os pesos corporais foram

avaliados duas vezes por semana como um indicador de GVHD (mudança no peso corporal como uma porcentagem do peso corporal inicial retratado na Figura 35), e o sangue foi coletado nos Dias 7, 10 e 14 para avaliar a expansão de vários linfócitos (dados para o Dia 14 são retratados respectivamente na Figura 36). A expressão de CD25 em células T CD8+ e CD4+ também foi avaliada como um marcador de ativação de células T (como ilustrado na Figura 37).

[00514] Os dados mostram cada uma das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 (ambos [C] e [NC]) GVHD aprimorada em comparação com o bloqueio de PD-1 sozinho (XENP16432 ou XENP28437), bem como por XENP24050 scIL-15/Rα-Fc sozinho como indicado por células CD45+, células T CD3+, CD8, células T e contagens de células T CD4+. No entanto, consistente com os dados in vitro acima, a combinação da fusão XENP25850 de IL-15/Rα-Fc direcionada a [C]PD-1 com XENP28437 levou a uma redução nas várias contagens de células, enquanto combina fusões XENP28532 (com base no mAb A) e XENP28692 (com base no mAb B) de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 resultaram em GVHD adicionalmente aprimorada, como indicado pelas contagens de células. Uma tendência semelhante também é observada usando a mudança no peso corporal como um indicador de GVHD como retratado na Figura 35, bem como para a ativação de células T CD8+ e CD4+ como retratado na Figura 37. Além disso, como retratado na Figura 38, parece haver uma preferência por células T CD4+ pelas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1, como indicado por uma razão de células T CD8+ para CD4+ mais baixa.

[00515] Em um segundo estudo de GVHD, camundongos NSG foram enxertados com 10 x 106 PBMCs humanas via IV-OSP no Dia -1 e dosados intraperitonealmente com os artigos de teste indicados nas concentrações indicadas nos Dias 0, 7, 14 e 21. Os pesos corporais foram avaliados duas vezes por semana como um indicador de GVHD, e o sangue foi coletado nos

Dias 7, 10 e 14 para avaliar a expansão de vários linfócitos (como retratado na Figura 39 para o Dia 10). A expressão de CD25 nas células T e CD4+ CD8+ também foi avaliada como retratado na Figura 40.

[00516] Como acima, os dados mostram que a fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 expandiu as contagens de células T em comparação com o bloqueio de anti-PD-1 sozinho. Além disso, os dados mostram uma resposta de dose clara para a expansão de células T, como indicado por GVHD aprimorado com concentrações mais altas (0,3 mg/kg vs. 0,1 mg/kg) de fusão XENP28532 de IL-15/Rα-Fc direcionado a [NC]PD-1. Notavelmente, a combinação de XENP28532 (a 0,3 mg/kg) e o mAb de bloqueio de PD-1 XENP28437 aumentou a expressão de CD25 em células T CD8+ e CD4+.

E. EXEMPLO 5: GERAÇÃO DE FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 COM VARIANTES ALTERNATIVAS DE POTÊNCIA DE IL-15

1. AS FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1 QUE COMPREENDE A VARIANTE DE IL-15(N4D/N65D) DEMONSTRAM UMA FARMACOCINÉTICA MENOS DO QUE FAVORÁVEL

[00517] Em um estudo que investigou a farmacocinética das variantes de potência IL-15/Rα-Fc com Xtend, macacos cynomolgus receberam uma primeira dose intravenosa (iv) única de XENP22853 (WT IL-15/Rα-heteroFc com Xtend), XENP24306 (IL- 15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-heteroFc com Xtend), XENP24113 (IL-15(N4D/N65D)/Rα-heteroFc com Xtend), XENP24294 (scIL-15(N4D/N65D)/Rα-Fc com Xtend), e XENP25937 ([C]IL-15 direcionado a PD-1(N4D/N65D)/Rα-Fc com Xtend) em concentrações variáveis.

[00518] A Figura 41 mostra a concentração sérica dos artigos de teste ao longo do tempo após a primeira dose. Como esperado, a incorporação de variantes de potência além da substituição de Xtend (como em XENP24306 e

XENP24113) melhora muito a farmacocinética das fusões de IL-15/Rα-Fc (em comparação com XENP22583). Inesperadamente, a fusão XENP25937 de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 que compreende a variante de IL-15(N4D/N65D) demonstrou farmacocinética substancialmente inferior em comparação com XENP24306. Da mesma forma, a fusão XENP24113 de IL-15/Rα-heteroFc e a fusão XENP24294 de scIL-15/Rα-Fc (que têm a mesma variante de potência de IL-15(N4D/N65D)) também demonstraram farmacocinética substancialmente inferior em comparação com XENP24306. Isso sugere que a farmacocinética inferior pode ser devido à variante de potência de IL-15 particular, em vez do formato da fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1. Embora uma diminuição na farmacocinética para XENP25937 (bem como XENP24113) fosse esperada com base nas fusões IL-15/Rα-Fc com a variante IL-15(N4D/N65D) demonstrando maior potência in vitro do que fusões de IL-15/Rα-Fc com a variante IL-15(D30N/E64Q/N65D) (como descrito no Exemplo 1B (a)), a diminuição na farmacocinética foi inesperadamente desproporcional ao aumento na potência. Consequentemente, procuramos identificar variantes alternativas de potência de IL-15 para uso nas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção.

2. MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1 QUE COMPREENDEM VARIANTES DE IL-15 COM MODIFICAÇÕES NA INTERFACE IL-15:CD132

[00519] Notamos que a variante IL-15(N4D/N65D) tem ambas as suas substituições na interface IL-15 responsáveis pela ligação a CD122, enquanto IL-15(D30N/E64Q/N65D) tem duas substituições (E64Q e N65D) na interface IL-15:CD122; e uma substituição (D30N) na interface IL-15 responsável pela ligação a CD132. Consequentemente, concluímos que a modificação na interface IL-15:CD132 pode contribuir para a farmacocinética superior observada para XENP24306. Portanto, gerou-se fusões de IL-15/Rα-

Fc direcionadas a PD-1 ilustrativas adicionais que compreende as variantes de IL-15(D30N/N65D), sequências para as quais são retratadas na Figura 42.

F. EXEMPLO 6: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1 INDUZEM INTERNALIZAÇÃO DE PD-1 EM CÉLULAS T

[00520] Em outro experimento investigando a atividade de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1, PBMCs humanas marcadas com CFSE foram incubadas por 4 dias a 37 ºC com 20 ng/ml de anti-CD3 ligado à placa (OKT3) e os seguintes artigos de teste: XENP28532 (fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 que compreende um braço αPD-1 com base no mAb A), XENP24306 (controle de fusão de IL-15/Rα-Fc não direcionada) e XENP26007 (controle fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV). As células foram então marcadas com αPD-1 XENP16432, que como mostrado no Exemplo 2C e Figura 34 não compete pela ligação com o braço direcionado a PD-1 de XENP28532, e analisadas por citometria de fluxo. Os dados que retratam a porcentagem de várias populações de células T que são PD-1+ são retratados na Figura 44. Observou-se surpreendentemente uma redução dependente da dose de PD-1 em células T após o tratamento com a fusão IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1, em comparação com o tratamento com os controles XENP24306 e XENP26007, indicando que os receptores PD-1 foram internalizados. Isso sugere uma ação potencial de longa duração para IL-15/Rα-a.Fc direcionada a PD-1, em que subsequente à eliminação eventual de moléculas de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1, a inibição imune por ligantes de PD-1 (por exemplo, PD-L1 e PD-L2) pode permanecer diminuída.

G. EXEMPLO 7: IDENTIFICAÇÃO DE UM [NC]PD-1 MAB C DE REATIVIDADE CRUZADA DE CYNOMOLGUS

[00521] Para facilidade de desenvolvimento clínico, é útil investigar vários parâmetros das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1, como farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade em macacos cynomolgus. Consequentemente, buscamos identificar braços direcionados a [NC]PD-1 de

reação cruzada para PD-1 humano e de cynomolgus. Identificamos um domínio de ligação anti-PD-1 adicional (referido neste documento como mAb C), que se humanizou usando a otimização do conteúdo de string (consultar, por exemplo, Patente nº US 7.657.380, emitida em 2 de fevereiro de 2010), sequências para as quais são retratadas nas Figuras 43 (sequências de domínio variável) e 45 (mAbs bivalentes como XENP28536, XENP28537, XENP28538 e XENP28539).

1. O MAB C ANTI-PD-1 TEM REATIVIDADE CRUZADA PARA PD-1 HUMANO E DE CYNOMOLGUS

[00522] Investigou-se a ligação de XENP28536, XENP28537, XENP28538 e XENP28539 a PD-1 humano e de cynomolgus usando Octet, como geralmente descrito acima. Em particular, biossensores anti-Fc humano (AHC) foram usados para capturar os anticorpos e mergulhados em múltiplas concentrações de PD-1-His humano e de cynomolgus para determinar KD, os dados para os quais são retratados na Figura 46. Os dados mostram que as variantes humanizadas XENP25836 e XENP25837 se ligaram a humanos e a cynomolgus com KD semelhante. Notavelmente, as variantes humanizadas XENP25838 e XENP28539 perderam sua capacidade de se ligar a PD-1 humano e de cynomolgus. Em comparação, o XENP28519 (mAb A humanizado) liga-se mais fortemente ao PD-1 humano, mas não apresenta reação cruzada para o PD-1 cynomolgus.

2. O MAB C ANTI-PD-1 NÃO COMPETE PELA LIGAÇÃO COM NIVOLUMABE E PEMBROLIZUMABE

[00523] Para investigar se o mAb C competia com o nivolumabe e o pembrolizumabe, realizou-se o binning de epítopo em tandem no mAb C quimérico, como descrito no Exemplo 2C. Os dados são retratados na Figura 47 para XENP16432, XENP21461 e mAb C quimérico. O binning mostra que o mAb C anti-PD-1 não compete com nivolumabe ou pembrolizumabe e é um bloqueador parcial da interação PD-1:PD-L1.

H. EXEMPLO 8: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 COM BASE EM MAB C

[00524] Fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 no formato "scIL-15/Rα x Fab" com base em variantes de mAb C e IL-15 foram projetadas e produzidas como geralmente descrito no Exemplo 3, sequências ilustrativas para os quais estão retratados na Figura 48. Deve-se notar que as fusões foram produzidas com variantes de IL-15(N4D/N65D), bem como variantes de IL-15(D30N/N65D) em linha com a noção descrita no Exemplo 5 de que variantes de IL-15 compreendem modificações na interface IL-15:CD132 podem ter farmacocinética aprimorada. Além disso, as sequências para análogos de Xtend Fc (M428L/N434S) são retratadas na Figura 49.

1. 8A: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 COM BASE EM MAB C SÃO ATIVAS IN VITRO

A. 8A(A): INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T

[00525] PBMCs humanas foram estimuladas com 500 ng/ml de anti-CD3 ligado à placa (OKT3) por 48 horas, rotulados com CFSE e incubados por 4 dias a 37 ºC com os seguintes artigos de teste: XENP28543 (IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 com base no mAb C_H1L1 e IL-15 (N4D/N65D)), XENP28532 ([NC] IL-15/Rα-Fc direcionado para PD-1 com base no mAb A_H1L1 e IL-15 (N4D/N65D)), XENP24306 (IL-15/Rα-heteroFc não direcionado com base em IL-15(D30N/E64Q/N65D)) e XENP26007 (controle IL-15/Rα-Fc direcionado a RSV com base em motavizumabe e IL-15(N4D/N65D)). Após a incubação, as células foram coradas com os seguintes anticorpos: anti-LAG-3-PE (3DS223H), anti-CD8-PerCP-Cy5.5 (SK1), anti-CD3-PE-Cy7 (OKT3), anti-PD-1-Alexa647 (XENP16432, corado com Alexa Fluor™ 647 Antibody Labeling Kit), anti-CD45RO-APC-Fire750 (UCHL1), anti-HLA-DR-Alexa700 (L243), anti-TIGIT-BV421 (A15153G), anti-CD16-BV605 (3G6), anti-CD56-BV605 (HCD56), anti-CD25-BV711 (M-A251), anti-CD45RA-BV785 (HI100), anti-

CD4-BUV395 (SK3) e Zombie Aqua-BV510 e analisados por fluxo para várias populações de células.

[00526] Investigou-se a proliferação de várias populações de células T com base na diluição de CFSE (Zombie Aqua para excluir células mortas), cujos dados estão retratados na Figura 50. Ambas as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 induziram a proliferação de células T CD8+ e CD4+. Notavelmente, as fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 foram mais potentes na indução da proliferação de células T CD4+ em comparação com fusão de IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc não direcionada (bem como a fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV), mas menos potente na indução da proliferação de células T CD8+. Além disso, o XENP28532 (braço direcionado a PD-1 com base no mAb A) pareceu mais potente do que o XENP28543 (braço direcionado a PD-1 com base no mAb C) na indução da proliferação de células T CD8+ e CD4+.

[00527] Curiosamente, como mostrado na Figura 51, o XENP28532 foi mais potente na indução da proliferação de células T CD8+LAG-3+ em comparação com a fusão de IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc não direcionada (bem como o fusão de controle de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV). Além disso, o XENP28543 foi mais potente na indução da proliferação de células T CD8+LAG-3+ do que a proliferação de células T CD8+ em massa (EC50 276,8 vs. 71,94). Coletivamente, isso suporta a noção de que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 podem ser seletivas para células T que expressam pontos de verificação como aqueles que seriam encontrados no ambiente do tumor.

[00528] Investigou-se também a proliferação de populações de memória (CD45RA-) e virgem (CD45RA+), como ilustrado na Figura 52. Notavelmente, embora as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 fossem mais potentes do que a fusão de IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc não direcionada na indução da proliferação de células T CD4+CD45RA-, as

mesmas foram menos potentes em induzir a proliferação de células T CD4+CD45RA+, sugerindo uma seletividade para células T de memória.

[00529] Finalmente, investigou-se a expressão de PD-1 em várias populações de células T (coradas usando XENP16432, que, como mostrado no presente documento, se encaixa em um epítopo diferente do mAb A e mAb C). Os dados, como retratado na Figura 53, mostram uma redução dependente da dose de PD-1 em células T CD4+CD45RA- após o tratamento com ambas as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1, em comparação ao tratamento com os controles XENP24306 e XENP26007, indicando que os receptores PD-1 foram internalizados. Notavelmente, a regulação negativa de PD-1 foi induzida de forma mais potente por XENP28532, com um braço direcionado a PD-1 com base no mAb A.

B. 8A (B): INDUÇÃO DA SECREÇÃO DE CITOCINAS

[00530] PBMCs humanas foram pré-estimuladas com várias concentrações de anti-CD3 ligado à placa (OKT3) por 48 horas a 37 ºC, rotulados com CFSE e incubados com os artigos de teste indicados por 4 dias a 37 ºC. O sobrenadante foi recolhido e avaliado pelo V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Human Kit (de acordo com o protocolo do fabricante; Meso Scale Discovery, Rockville, Md.). Os dados retratados na Figura 54 mostram que tanto o XENP28532 quanto o XENP28543 foram capazes de estimular potentemente a secreção de IFNγ. Notavelmente, XENP28532 (braço direcionado a PD-1 com base no mAb A) pareceu mais ativo do que XENP28543 (braço direcionado a PD-1 com base no mAb C) na indução da secreção de IFNγ.

C. 8A(C): O BLOQUEIO DE PD-1 NÃO INTERFERE COM A ATIVIDADE DE FUSÃO DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADA A [NC]PD-1 COM BASE NO MAB C IN VITRO

[00531] Investigou-se a interferência potencial do bloqueio de PD-1 com a atividade de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 com base

no mAb C, como descrito no Exemplo 4A. Os dados retratados na Figura 55 mostram que a pré-incubação de PBMCs com XENP16432 ou pembrolizumabe não afetou a ativação de células T pela fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 XENP28543 em comparação com quando PBMCs eram pré-incubadas com mAb anti-RSV XENP15074. Isso sugere que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com o braço direcionado a PD-1 com base no mAb C poderiam ser empilhadas com mAbs anti-PD-1 sem efeito negativo.

2. 8B: FUSÕES DE IL-15/RαA-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 COM BASE EM MAB C AUMENTAM GVHD IN VIVO E COMBINAM COM BLOQUEIO DE PD-1

[00532] No segundo estudo de GVHD descrito no Exemplo 4B, investigou-se também a atividade in vivo de XENP28543 em várias concentrações, sozinho e em combinação com o bloqueio de PD-1. Os dados que retratam a mudança no peso corporal (como uma porcentagem do peso corporal inicial) ao longo do tempo são retratados na Figura 56, e os dados que retratam o peso corporal (como uma porcentagem do peso corporal inicial) nos Dias 11, 14 e 18 são retratados na Figura 57. Investigou-se também a expansão e ativação de várias populações de linfócitos, cujos dados são retratados nas Figuras 58 a 59 para o Dia 14. Coletivamente, os dados mostram que a combinação de fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 com bloqueio de PD-1 aumentou significativamente GVHD em relação ao tratamento com apenas fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1. O aumento em efeito é especialmente pronunciado no contexto de combinações de concentrações mais baixas (ou seja, 0,1 mg/kg) de fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com bloqueio de PD-1.

3. 8C: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 COM BASE EM MAB C COMBINAM COM BLOQUEIO DE PD-1 PARA AUMENTAR A ATIVIDADE ANTITUMORAL EM CAMUNDONGOS

NSG

[00533] Camundongos NSG (10 por grupo) foram inoculados intradermicamente com 3 x 10^6 células MCF-7 transduzidas por pp65 no Dia -15. Os camundongos foram então injetados intraperitonealmente com 5 x 10^6 PBMCs humanas (ou PBS para controle) e tratados com os artigos de teste indicados no Dia 0, e posteriormente tratados com os artigos de teste indicados nos Dias 7, 14, 21, 29 e 36. O volume do tumor foi medido por calibrador três vezes por semana, os pesos corporais foram medidos uma vez por semana e o sangue foi coletado uma vez por semana.

[00534] O volume do tumor ao longo do tempo está retratado na Figura 60 e o volume do tumor nos dias 26, 28, 30, 33, 35 e 37 está retratado na Figura 61. Os dados mostram que, no dia 28, a combinação de XENP28543 com o bloqueio de PD-1 reduziu significativamente o tamanho do tumor em relação ao tratamento com o bloqueio de PD-1 sozinho. Investigou-se também a expansão e ativação de várias populações de linfócitos, cujos dados estão retratados nas Figuras 62 a 63. Notavelmente, as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1, sozinhas ou em combinação com o bloqueio de PD-1, permitiram uma indução precoce significativamente melhorada (Dia 7 pós-dose) da ativação de células T CD8+ em comparação com Bloqueio PD-1 sozinho; e ambas as fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 em combinação com o bloqueio de PD-1 permitiram uma indução precoce significativamente melhorada (dia 7 pós-dose) da ativação de células T CD4+ em comparação com o bloqueio de PD-1 sozinho. Além disso, no dia 14, as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1, sozinhas ou em combinação com o bloqueio de PD-1, permitiram a expansão significativamente aumentada de numerosas populações de linfócitos em comparação com o bloqueio de PD-1 sozinho.

I. EXEMPLO 9: FUSÕES DE IL-15/RA-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 COM BRAÇO DIRECIONADO A PD-1 OTIMIZADO POR AFINIDADE

1. 9A: OTIMIZAÇÃO POR AFINIDADE DE ABD BASEADO EM MAB C

[00535] Como descrito no Exemplo 8A, em certos contextos, como regulação negativa in vitro de PD-1, proliferação de células T e indução da secreção de citocinas, XENP28532 (braço direcionado a PD-1 com base no mAb A) pareceu mais potente e/ou ativo do que XENP28543 (braço direcionado a PD-1 com base no mAb C). Como observado no Exemplo 7A, o mAb bivalente com base no mAb A humanizado (XENP28519) se ligou mais fortemente do que o mAb bivalente com base no mAb C humanizado (XENP28536) ao PD-1 humano. Em vista disso, raciocinamos que a afinidade do braço direcionado a PD-1 para PD-1 pode impactar a atividade da fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada para PD-1. Consequentemente, criamos variantes otimizadas por afinidade de mAb C. Uma biblioteca de variantes foi construída por mutagênese padrão para introduzir mutações pontuais nas regiões pesadas variáveis ou leves variáveis de XENP28536. Sequências ilustrativas para as quais estão retratadas nas Figuras 43 (sequências de domínio variável) e 64 (mAbs bivalentes). As telas de afinidade das variantes de mAb C[PD-1]_H1L1 projetadas por afinidade (no formato de IgG1 bivalente com variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236_/S267K) foram realizadas no octeto como geralmente descrito acima, os dados para os quais são retratados na Figura 65. De 304 variantes com mutação de ponto único na região variável pesada ou variável leve, identificamos apenas 11 variantes (incluindo mAb C[PD-1]_H1_L1.1 e mab_C[PD-1]_H1_L1.3) com afinidade melhorada mais de 2 vezes sobre WT. As substituições VH favoráveis ocorreram nas posições 32, 52A e 97 (numeração de acordo com Kabat); e as substituições de VL favoráveis ocorreram nas posições 27D, 30, 93 e 94 (numeração de acordo com Kabat).

[00536] Para aumentar ainda mais a afinidade, variantes VH de substituição única favoráveis e variantes VL de substituição única foram combinadas. Essas novas variantes de combinação VH/VL foram construídas

no contexto de fusões de IL15/Rα-Fc direcionadas a PD-1. Os dados que descrevem a afinidade das fusões para PD-1 são mostrados na Figura 66. Notavelmente, H1.19_L1.1 tem maior afinidade do que H1.132_L1.1, apesar de H1.132_L1 fornecer maior afinidade do que H1.19_L1, sugerindo aumento de afinidade sinérgica fornecido pela substituição de F32L em VH (numeração de acordo com Kabat) como em H1.19.

[00537] Em seguida, substituições únicas favoráveis no VH e/ou VL foram combinadas com novas variantes construídas no contexto das fusões de IL15/Rα-Fc direcionadas a PD-1. Os dados que descrevem a afinidade das fusões para PD-1 são retratados na Figura 67. A variante L1.140 de VL de substituição tripla (que compreende histidina na posição 27D, tirosina na posição 30 e treonina na posição 93; numeração de acordo com Kabat) demonstrou uma melhora de 36 vezes em KD em relação ao tipo selvagem e combina bem com variantes VH (por exemplo H1.132 e H1.175) para exercer uma melhoria de aproximadamente 100 vezes em KD em relação ao tipo selvagem.

[00538] Notavelmente, uma escada de variantes de afinidade foi gerada pela combinação de substituições únicas no VH ou VL, bem como pela combinação de variantes VH e variantes VL que encontram uso no ajuste da potência e seletividade de fusões de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1.

[00539] Fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 no formato "scIL-15/Rα x Fab" com base em mAb C de afinidade aprimorada e variantes de IL-15 foram projetadas e produzidas como geralmente descrito no Exemplo 3, sequências ilustrativas para as quais são retratadas na Figura 68 como XENP30046, XENP30047, XENP30049 e XENP30050. Além disso, as sequências para análogos de Xtend Fc (M428L/N434S) são retratadas na Figura 69.

2. 9B: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 COM LIGAÇÃO DE PD-1 APRIMORADA AUMENTARAM A ATIVIDADE IN

VITRO

[00540] Em seguida, investigou-se o impacto do braço direcionado a PD-1 com afinidade aprimorada (bem como a variante de IL-15(D30N/N65D)) nas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção. PBMCs humanas foram estimuladas por 48 horas com 500 ng/ml de anti-CD3 ligado a placa (OKT3) e então rotulados com CFSE e incubados com os artigos de teste por 4 dias a 37 ºC. As células foram coradas com os seguintes anticorpos: anti-CD8-PerCP-By5.5 (SK1), anti-CD3-PE-Cy7 (OKT3), anti-PD-1-Alexa647 (XENP16432, corado com Alexa Fluor™ 647 Antibody Labeling Kit), anti-CD45RO-APC-Fire750 (UCHL1), anti-HLA-DR-Alexa700 (L243), anti-CD107a-BV421 (H4A3), anti-CD16-BV605 (3G6), anti-CD56-BV605 (HCD56), anti-CD25-BV711 (M-A251), anti-CD45RA-BV785 (M-A251), anti-CD4-BUV395 (SK3) e Zombie Aqua (BV510) e analisado por citometria de fluxo para várias populações de células.

[00541] Investigou-se a proliferação de várias populações de células T com base na diluição de CFSE (Zombie Aqua para excluir células mortas), cujos dados estão retratados na Figura 70; a ativação de várias populações de células T com base na expressão de CD25 (um marcador de ativação de células T de estágio avançado), os dados para os quais são retratados nas Figuras 71 e 72; e expressão de PD-1 em várias populações, os dados para os quais são retratados na Figura 73 para células T CD4+CD45RA-PD-1+.

[00542] Coletivamente, os dados mostram que a atividade das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 se correlacionam com a afinidade de PD-1. Por exemplo, como mostrado na Figura 70, XENP30046 (tendo um braço direcionado a PD-1 com afinidade aumentada) induz a proliferação de células T CD8+ e CD4+ mais potentemente do que XENP28543 (aumento de 2 vezes). Notavelmente, mesmo a regulação decrescente de PD-1 em células T pelas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 se correlaciona com a

afinidade de PD-1, como mostrado na Figura 73. Além disso, os dados mostram que a variante IL-15(D30N/N65D) não afeta drasticamente a atividade das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1.

3. 9C: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 COM LIGAÇÃO DE PD-1 APRIMORADA AUMENTARAM A ATIVIDADE IN VIVO

[00543] Os camundongos NSG foram enxertados com 10 x 10^6 PBMCs humanas por meio de IV-OSP no Dia -1 e dosados intraperitonealmente nos Dias 0, 7 e 14 com os seguintes artigos de teste: XENP28437 (mAb anti-PD-1 baseado em pembrolizumabe com variantes de ablação E233P/L234V/L235A/G236del/S67K) e XENP29481 (fusão de controle de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV tendo a variante IL-15 D30N/N65D; sequências para as quais são retratadas na Figura 31). Os pesos corporais foram avaliados duas vezes por semana como um indicador de GVHD, os dados para os quais são retratados nas Figuras 74 e 75 como uma mudança no peso corporal inicial. Notavelmente, o tratamento com XENP30046 sozinho (tendo o braço direcionado a PD-1 com afinidade aprimorada) resultou em perda significativa de peso corporal como medido nos Dias 11 e 18 em comparação com o tratamento com PBS, enquanto o tratamento com XENP28543 sozinho não produziu perda de peso significativa (em comparação com o tratamento com PBS).

[00544] O sangue foi coletado nos dias 7, 10 e 14 para investigar a expansão de linfócitos humanos, bem como para investigar a secreção de citocinas, os dados para os quais são retratados na Figura 76. Coletivamente, os dados geralmente mostram atividade intensificada pelas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 com braço direcionado a PD-1 com afinidade aprimorada. Além disso, os dados mostram que a IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 se combina produtivamente com o bloqueio de PD-1 (XENP28437).

[00545] Além disso, como mostrado nas Figuras 78 e 79, XENP30046 aumentou significativamente a expansão de células CD45+, células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+ e células NK até o Dia 11 em comparação com a dosagem com XENP28543 que é mantida para todas as populações (exceto Células NK) até o Dia 14. Além disso, como mostrado na Figura 77, XENP30046 aumentou significativamente a ativação precoce (Dia 7 pós-dose) de células T CD8+ e CD4+ (como indicado pela expressão de CD25) em comparação com XENP28543.

J. EXEMPLO 10: POTÊNCIA DE AJUSTE FINO E SELETIVIDADE DE FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1 POR AFINIDADE DE PD-1 E POTÊNCIA DE IL-15

[00546] Embora as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 tenham sido projetadas com o objetivo de serem direcionadas ao ambiente do tumor através do braço direcionado a PD-1, a porção química de citocina ainda é capaz de sinalizar antes de atingir o local do tumor e pode contribuir para a toxicidade sistêmica. Por conseguinte, buscou-se reduzir ainda mais a potência de IL-15 através da construção de fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 com a variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D), que como descrito no Exemplo 1B (a) reduziu drasticamente a atividade. As sequências para as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 ilustrativas que compreende a variante IL-15(D30N/E64Q/N65D) são retratadas nas Figuras 30 e 48 a 49 como XENP30428, XENP30429, XENP30430, XENP30519, XENP30516, XENP30517 e XENP30455. Além disso, construiu-se XENP30432, uma fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV que compreende variante IL-15(D30N/E64Q/N65D) (sequências para as quais estão retratadas na Figura 32), para atuar como um substituto para investigar o comportamento de fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 que compreende a variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D) fora do ambiente do tumor.

1. 10A: ATIVIDADE IN VITRO DE FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 AJUSTADAS PARA AFINIDADE DE PD-1 E POTÊNCIA DE IL-15

[00547] A atividade in vitro de fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 adicionais tendo várias afinidades de ligação a PD-1 e potências de IL-15. PBMCs humanas foram estimuladas por 48 horas com 500 ng/ml de anti-CD3 ligado a placa (OKT3) e então rotulados com CFSE e incubados com os artigos de teste por 4 dias a 37 ºC. As células foram coradas com os seguintes anticorpos: anti-CD8-PerCP-Cy5.5 (SK1), anti-CD3-PE-Cy7 (OKT3), anti-PD-1-Alexa647 (XENP16432, corado com Alexa Fluor™ 647 Antibody Labeling Kit), anti-CD45RO-APC-Fire750 (UCHL1), anti-HLA-DR-Alexa700 (L243), anti-CD107a-BV421 (H4A3), anti-CD16-BV605 (3G6), anti-CD56-BV605 (HCD56), anti-CD25-BV711 (M-A251), anti-CD45RA-BV785 (M-A251), anti-CD4-BUV395 (SK3) e Zombie Aqua (BV510) e analisado por citometria de fluxo para várias populações de células.

[00548] Investigou-se a proliferação de várias populações de células T com base na diluição de CFSE (Zombie Aqua para excluir células mortas), cujos dados estão retratados na Figura 80; a ativação de várias populações de células T com base na expressão de CD25 (um marcador de ativação de células T de estágio tardio), os dados para os quais são retratados na Figura 81 e 82; e a expressão de PD-1 em várias populações, os dados para os quais são retratados nas Figuras 83 e 84.

[00549] Os dados mostram que XENP30272 (que tem ligação de PD-1 de maior afinidade) é mais potente na indução de proliferação e ativação de várias populações de células T do que XENP30046 (que tem ligação de PD-1 de afinidade mais baixa) demonstrando a importância de ajustar a afinidade de PD-1. Notavelmente, enquanto XENP30429 (fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 tendo variante IL-15(D30N/E64Q/N65D)) foi apenas 1,8

a 2,5 menos ativo em células T CD8+ e CD4+ em comparação com XENP30046 (fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 tendo variante IL-15(N4D/N65D)), XENP30432 (IL-15/Rα-Fc direcionado a RSV substituto tendo variante IL-15(D30N/E64Q/N65D)) foi 12 vezes menos ativo em células T CD8+ e 530 vezes menos ativo em células T CD4+ em comparação com XENP30046 (com base na atividade proliferativa como retratado na Figura 80). Isto sugere que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 com a variante IL-15(D30N/E64Q/N65D) devem reter a atividade no ambiente do tumor, enquanto permanecem substancialmente inativas fora do ambiente do tumor.

2. 10B: ATIVIDADE IN VIVO DE FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 AJUSTADAS PARA POTÊNCIA DE IL-15

[00550] A expansão in vivo de linfócitos por fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 ajustadas para Potência de IL-15 foi investigada em um estudo GVHD. Os camundongos NSG foram enxertados com 10 x 10^6 PBMCs humanas por meio de IV-OSP no Dia -1 e dosados intraperitonealmente com os artigos de teste indicados nas concentrações indicadas nos Dias 0, 7 e 14. O sangue foi coletado nos dias 7, 10 e 14 para avaliar a expansão e ativação de vários linfócitos (os dados são mostrados nas Figuras 85 e 86). Coletivamente, os dados mostram que quando a afinidade de PD-1 é equivalente, IL-15 de maior potência (por exemplo, XENP30046) permite maior expansão (e ativação precoce) de células T em comparação com IL-15 de baixa potência (por exemplo, XENP30429).

K. EXEMPLO 11: IL-15/Rα-FC DIRECIONADO A [NC]PD-1 COM XTEND

[00551] Os análogos Xtend das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 foram projetadas com o objetivo de estender ainda mais a farmacocinética e a farmacodinâmica, sequências para as quais são retratadas ao longo das Figuras.

1. 11A: ANÁLOGOS DE XTEND DEMONSTRAM ATIVIDADE COMPARÁVEL IN VITRO

[00552] Investigou-se se os análogos Xtend eram comparáveis às moléculas não Xtend. PBMCs humanas foram estimuladas por 48 horas com 500 ng/ml de anti-CD3 ligado a placa (OKT3) e então rotulados com CFSE e incubados com os artigos de teste por 4 dias a 37 ºC. Os artigos de teste usados foram fusões de IL-15/Rα-XtendFc direcionadas com variante IL-15(N4D/N65D), IL-15(D30N/N65D) ou IL-15(D30N/E64Q/N65D) e braços direcionados com base em mAb C_H1L1 (baixa afinidade), mAb C_H1_L1.1 (alta afinidade), mAb C_H1_L1.3 (afinidade intermediária) ou αRSV. Após a incubação com os artigos de teste, as células foram coradas com os seguintes anticorpos: anti-CD25-PE (M-A251), anti-CD8-PE-Cy7 (SK1), anti-PD-1-Alexa647 (XENP16432, corado com Alexa Fluor™ 647 Antibody Labeling Kit), anti_CD45RO-APC-Fire750 (UCHL1), anti-CD16-BV605 (3G6), anti-CD56-BV605 (HCD56), anti-CCR7-GV711 (G043H7), anti-CD45RA-BV785 (HI100), anti-CD4-BUV395 (SK3), anti-CD3-BUV496 (UCHT1), anti-CD95-BUV737 (DX2), anti-CD28-BV650 (CD28.2) e Zombie Aqua (BV510) e analisado por citometria de fluxo para várias populações de células.

[00553] Investigou-se a proliferação de várias populações de linfócitos com base na diluição de CFSE (Zombie Aqua para excluir células mortas), cujos dados estão retratados na Figura 87; a ativação de várias populações de células T com base na expressão de CD25, os dados para os quais são retratados na Figura 88; e expressão de PD-1 em várias populações, os dados para os quais são retratados na Figura 89. Coletivamente, os dados mostram as mesmas tendências do Exemplo 10. Além disso, os dados mostram que os análogos Xtend são comparáveis aos análogos não Xtend. Por exemplo, o EC50 para XENP30046 é comparável ao EC50 para XENP30290 (o Xtend análogo ao XENP30046).

2. 11B: ANÁLOGOS DE XTEND DEMONSTRAM ATIVIDADE ANTITUMORAL E COMBINAM COM BLOQUEIO DE PD-1

[00554] Para este estudo, camundongos NSG que eram MHC I/II-DKO (NSG-DKO) e, portanto, resistentes a GVHD foram usados. Camundongos NSG-DKO (10 por grupo) foram inoculados intradermicamente com 3 x 10^6 células MCF-7 transduzidas por pp65 no Dia -15. Os camundongos foram então injetados intraperitonealmente com 2,5 x 10^6 PBMCs humanas e tratados com as combinações de artigos de teste/artigo de teste indicadas no Dia 0, e ainda tratados com os artigos de teste indicados nos Dias 7, 14 e 21. O volume do tumor foi medido por calibrador três vezes por semana, os pesos corporais foram medidos uma vez por semana e o sangue foi coletado uma vez por semana.

[00555] O volume do tumor ao longo do tempo está retratado na Figura 90 e o volume do tumor nos Dias 11, 14, 17, 19, 21, 24, 26 e 28 está retratado na Figura 91 (estatísticas realizadas em dados corrigidos de linha de base usando o teste de Mann-Whitney). Os dados mostram que no Dia 11, o XENP30290 (1 mg/kg) sozinho e a combinação de XENP30516 (3 mg/kg) com o bloqueio de PD-1 reduziu significativamente o tamanho do tumor em relação ao tratamento com o bloqueio de PD-1 sozinho. No Dia 28, todas as combinações de XENP30290 (0,1, 0,3 ou 1 mg/kg) ou XENP30516 (0,3, 1 ou 3 mg/kg) com o bloqueio de PD-1 efetuou redução significativa do tamanho do tumor em relação ao tratamento com bloqueio de PD-1 sozinho.

[00556] Os dados que retratam a expansão de várias populações de linfócitos são retratados nas Figuras 92 a 93 (estatísticas para a expansão de células CD45+ realizada em dados transformados em log usando teste t não pareado). Notavelmente no Dia 14, as várias doses de XENP30290 ou XENP30516, isoladamente ou em combinação com o bloqueio de PD-1, permitiram a expansão significativamente aumentada de linfócitos em comparação com o bloqueio de PD-1 sozinho. Embora as fusões de IL-15/Rα-

Fc direcionadas a RSV também tenham expandido linfócitos, consistentes com os dados retratados no Exemplo 10, as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a RSV induziram muito menos expansão de linfócitos do que sua fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 de contraparte (isto é, tendo uma variante de IL-15 equivalente); e XENP30518 que compreende a variante IL-15 (D30N/E64Q/N65D) induziu menos expansão de linfócitos do que XENP30362 que compreende a variante IL-15 (N4D/N65D) mais potente. Como acima, isso indica que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 serão ativas no ambiente do tumor, mas permanecerão substancialmente inativas fora do ambiente do tumor.

L. EXEMPLO 12: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1 EXPANDEM SELETIVAMENTE AS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS PD-1$^+$.

[00557] O Exemplo 3C mostrou que as fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção são seletivas para linfócitos ativados. Aqui, é ainda demonstrado in vivo que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 são particularmente seletivas para populações de linfócitos PD-1+.

[00558] Camundongos Hu-NSG com CD34+ que são camundongos NSG enxertados com células estaminais hematopoiéticas CD34+ humanas de modo a desenvolver um sistema imunitário humano funcional sem reatividade para o hospedeiro foram obtidos no Laboratório Jackson (Bar Harbor, Maine). Investigou-se os níveis de expressão de PD-1 em várias populações de linfócitos no sangue retirado dos camundongos antes da dosagem com artigos de teste, os dados para os quais são retratados na Figura 94. Os dados mostram que os camundongos Hu-NSG com CD34+ têm um perfil de expressão de PD-1 semelhante ao de seres humanos, ou seja, maior expressão de PD-1 em populações de memória efetora. A atividade das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 nos camundongos Hu-NSG com CD45+ deve refletir a atividade das moléculas em humanos.

[00559] Os camundongos foram dosados intraperitonealmente com 0,3 mg/kg de XENP30046 (IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 que compreende mAb C_H1_L1.1 e variante IL-15(N4D/N65D); n = 5), 0,3 mg/kg de XENP30429 (IL-15/Rα-Fc direcionada a [NC]PD-1 que compreende mAb C_H1_L1.1 e variante IL-15(D30N/E64Q/N65D); n = 5), 0,3 mg/kg de XENP26007 (IL-15/Rα-Fc direcionado a RSV de controle que compreende variante IL-15(N4D/N65D); n = 4), ou 0,3 mg/kg de XENP30432 (IL-15/Rα-Fc direcionada a RSV de controle que compreende variante IL-15(D30N/E64Q/N65D); n = 5) no Dia 0. O sangue foi coletado nos dias 0, 4, 7 e 10 para investigar a expansão de várias populações de linfócitos, os dados para os quais são retratados nas Figuras 95 a 102.

[00560] Os dados mostram que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 (XENP30046 e XENP30429) expandem as populações de células PD-1+ (por exemplo, populações de memória efetora CD4 e CD8), com expansão de mais de 100 vezes nas populações de memória efetora por XENP30046. A Figura 102 ilustra que a quantidade de expansão celular por XENP30046 e XENP30429 está correlacionada com a expressão de PD-1 de linha de base em cada uma das populações de linfócitos. Além disso, como retratado nas Figuras 100 e 101, XENP30429 induziu muito pouca expansão de células virgens de CD4 e CD8 (PD-1 baixo), indicando que a redução da potência do braço de IL-15 melhora a seletividade para células T ativadas. Notavelmente, as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a RSV (XENP26007 e XENP30432) mostram níveis muito baixos de expansão, indicando que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 da invenção devem ter linfócitos periféricos mínimos expansão.

M. EXEMPLO 13: FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DE FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A [NC]PD-1 AJUSTADAS PARA AFINIDADE DE PD-1 E POTÊNCIA DE IL-15 EM MACACOS CYNOMOLGUS

[00561] Com base em análises adicionais de dados coletados do estudo de cynomolgus descrito no Exemplo 5A, foi constatado que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 diminuem a ativação de células NK enquanto expandem células T CD8+ em macacos cynomolgus (consultar a Figura 103). Notavelmente como retratado na Figura 104, a fusão de IL-15/Rα-Fc direcionada a PD-1 foi seletiva para células T de memória efetoras CD8.

[00562] Em outro estudo in vivo em macacos cynomolgus, a farmacocinética e a farmacodinâmica das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a [NC]PD-1 ajustadas para afinidade de PD-1 e potência de IL-15 foram investigadas. Macacos Cynomolgus (n = 3) foram aclimatados por 13 dias (começando no Dia -13), seguido por administração intravenosa de uma primeira dose inferior (dose 3X) de artigos de teste indicados no Dia 1 e uma administração intravenosa de uma segunda dose mais elevada (Dose de 10X) dos artigos de teste indicados no Dia 22. O sangue foi coletado ao longo do estudo para investigar a farmacocinética e a farmacodinâmica, cujos dados estão retratados nas Figuras 105 a 106.

[00563] A Figura 105 retrata a expansão de várias populações de linfócitos em macacos cynomolgus após administração com XENP30290 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15 [N4D/N65D]) ou XENP30362 (αRSV x IL-15 [N4D/N65D]). Coletivamente, os dados mostram que o XENP30290 (tendo alta afinidade para PD-1 e maior potência para IL-15) permitiu farmacodinâmica periférica sustentada por 2 a 3 semanas com expansão modesta de células PD1. Em particular, as células T γδ são a população de células com maior expansão de dobra; as células T virgens de CD4+ e CD8+ são a população de células em expansão com a menor dobra; e as células de memória das células-tronco CD8+ são a população relevante de maior expansão.

[00564] A Figura 106 retrata a expansão de várias populações de linfócitos em macacos cynomolgus após a administração com qualquer

XENP30516 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15 [D30N/E64Q/N65D]) ou XENP30518 (αRSV x IL-15 [D30N/E64Q/N65D]). Coletivamente, os dados mostram que o XENP30516 (tendo alta afinidade para PD-1 e baixa potência de IL-15) permitiu farmacodinâmica periférica sustentada sem expansão significativa de células PD1. Consistente com o XENP30290, as células T γδ são a população de células que se expande com maior dobra; As células T virgens de CD4+ e CD8+ são a população de células em expansão com a menor dobra; e as células de memória das células-tronco CD8+ são a população relevante de maior expansão.

[00565] As Figuras 107 a 111 retratam a farmacocinética dos vários artigos de teste com diferentes afinidades para PD-1 (incluindo controle direcionado para RSV) e/ou potência de IL-15. Coletivamente, os dados mostram um impacto aparente da afinidade de PD-1 e da potência de IL-15 na PK. Por exemplo, como ilustrado na Figura 107, XENP30290 que tem a afinidade de PD-1 mais alta e potência de IL-15 mais alta resultou em eliminação mais rápida do que XENP30291 e XENP29439 que têm afinidade de PD-1 mais baixa. No entanto, o XENP30516 que tem a afinidade de PD-1 mais alta, mas a potência de IL-15 mais baixa resultou em uma depuração mais lenta do que o XENP30290. Esta mesma tendência é ilustrada na Figura 111 para XENP30362 e XENP30518 que são fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a αRSV, respectivamente, com potência de IL-15 superior e inferior. Notavelmente, não pareceu haver qualquer diferença aparente na PK para artigos de teste que compreende IL-15[N4D/N65D] e que compreende IL-15[D30N/N65D].

[00566] Finalmente, a Figura 112 retrata a expressão de PD1 em várias populações de linfócitos após o tratamento com XENP30290, XENP30516 e XENP30362. Os dados mostram que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 aumentam a expressão de PD-1. A Figura 113 mostra a correlação entre o pico de expansão de todos os subconjuntos de memória de células T e o

pico de expressão de PD-1. Embora as implicações disso possam exigir uma investigação mais aprofundada, a expressão aumentada de PD-1 pode fornecer um laço de retroalimentação positiva para efeito intensificado das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1.

[00567] Em outro estudo in vivo em macacos cynomolgus, a seletividade in vivo das fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 conferidas por diferentes variantes de IL-15 foram investigadas. Macacos Cynomolgus (n = 3) foram aclimatados por 13 dias (começando no Dia -13), seguido por administração intravenosa das fusões de IL-15/Rα-Fc de potência reduzida indicada de PD-1-alvo (e controle de RSV-alvo) em várias concentrações de dose (1X dose baixa, 3X dose intermediária, 10X dose alta ou 30X dose muito alta). O sangue foi coletado ao longo do estudo para investigar a farmacocinética e a farmacodinâmica, os dados para as quais são retratados nas Figuras 114 a 119.

[00568] As seguintes observações foram feitas: XENP30290 induziu a expansão de células PD1+ em 1X dose baixa (Figura 114); XENP30290 induziu boa expansão de células PD1+ em alta dose 10X, mas tem atividade moderada em células PD1- como mostrado pela atividade de controle direcionado a RSV XENP30362 (Figura 115); XENP30516 induziu boa expansão de células PD1+ em alta dose 10X com boa seletividade (Figura 116); e XENP30516 induziu maior expansão de PD1+ a uma dose muito alta de 30X, mantendo a seletividade excelente (Figura 117). Coletivamente, os dados mostram que o aumento da dose resulta em maior seletividade. Além disso, as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 que compreendem a variante IL-15[D30N/E64Q/N65D] eram mais seletivas do que as fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 que compreendem a variante IL-15[N4D/N65D].

N. EXEMPLO 14: IL-15 DIRECIONADA A PD-1 REVERTE A SUPRESSÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T

[00569] Além de proliferar células T efetoras, IL-15 também pode ligar receptores em Tregs e aumentar sua proliferação; no entanto, Tregs suprimem a resposta imune, portanto, são consideradas desfavoráveis para o tratamento oncológico.

[00570] Foi relatado anteriormente que a rapamicina promove a proliferação de Tregs CD4+CD25+FOXP3+ in vitro, e as Tregs expandidas resultantes suprimem a proliferação de células T CD4+ e CD8+ (consultar, por exemplo, Battaglia et al. (2006) Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. J. Immunol. 177 (12) 8.338 a 8.347; e Strauss et al. (2007) Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin. J. Immunol. 178 (1) 320 a 329). Consequentemente, para experimentos no presente documento investigando a relação entre IL-15, Tregs e outras células T, Tregs expandidas com rapamicina foram usadas. As células T CD4+ foram enriquecidas a partir de PBMCs humanas por seleção negativa usando o kit EasySep™ Human CD4+ T Cell Enrichment (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canadá). Treg foram expandidas usando Dynabeads™ Human Treg Expander (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass.) Em RPMI1640+ 10% de soro fetal bovino + 0,1 μg/ml de rapamicina + 500 U/ml de IL-2 por 1 a 4 dias. Tregs foram transferidos para frascos T75 revestidos com 0,5 μg/ml de anti-CD3 (OKT3, Biolegend, San Diego, Califórnia) e cultivados com RPMI1640 + 10% de soro fetal bovino + 0,1 μg/ml de rapamicina + 500 U/ml IL-2 + MAb anti-CD28 a 0,5 μg/ml. Experimentos utilizando Tregs expandidas com rapamicina foram realizados pelo menos 8 dias após o enriquecimento inicial de células T CD4+ de PBMCs.

1. 14A: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1 REDUZEM A PROLIFERAÇÃO DE TREGS

[00571] Para investigar a proliferação de Tregs por IL-15, 1,25 x 10^5

Tregs marcadas com violeta Tag-it foram incubados com as doses indicadas de fusões de IL-15/Rα-Fc ilustrativas XENP20818 (WT IL-15) ou XENP24045 (IL-15[D30N/E64Q/N65D]) (sequências retratadas na Figura 120), bem como fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 ilustrativas em RPMI com 10% de soro fetal bovino (sem quaisquer outros suplementos) por 4 dias. Os dados retratados na Figura 121 mostram que as fusões de IL-15/Rα-Fc (direcionadas e não direcionadas) induzem a proliferação das Tregs expandidas com rapamicina. Notavelmente, as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 foram muito menos potentes na indução da proliferação de Tregs em comparação com as fusões de IL-15/Rα-Fc não direcionadas.

2. 14B: FUSÕES DE IL-15/Rα-FC DIRECIONADAS A PD-1 AUMENTAM A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T EFETORAS E REDUZEM A SUPRESSÃO DE TREG

[00572] 1 x 10^5 PBMCs marcadas com CFSE (número fixo) foram semeadas com a razão indicada de Tregs expandidas com rapamicina marcadas com Violeta Tag-it e 5 µg/ml de fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas ilustrativas em anti-CD3 ligado à placa (OKT3; 100 ng/ml). Após 4 dias de incubação a 37 ºC, as células foram analisadas por citometria de fluxo. A proliferação foi medida por CFSE (para células T) ou diluição Tag-it Violet (para Tregs) e corante Zombie foi usado para excluir células mortas.

[00573] Os dados retratados na Figura 122 mostram que as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 mudaram (reduziram) a potência da supressão induzida por Treg da proliferação de células T CD8 e CD4 efetoras de memória. Notavelmente, a mudança pelas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a RSV foi menor do que a redução na potência induzida pelas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 (novamente, indicando que este deve ser um efeito específico do ambiente do tumor).

[00574] Os dados retratados na Figura 123 mostram a razão de

contagens de células Treg/CD8 TEM e Treg/CD4 TEM. Os dados mostram que, em comparação com artigos sem teste, as fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 aumentaram a razão Treg/TEM, e ainda a proliferação de células TEM é aumentada pelas fusões de IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1. Isso indica que embora as Tregs sejam expandidas, as Tregs expandidas demonstram notavelmente uma capacidade supressiva diminuída.

3. 14C: MECANISMO PARA REDUÇÃO DA SUPRESSÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T

A. 14C(A): TREGS TRATADAS COM FUSÃO DE IL-15/Rα-FC MOSTRAM POPULAÇÃO E TREG REDUZIDA AO LONGO DO TEMPO

[00575] Em um primeiro experimento para investigar o mecanismo de supressão reduzida, Tregs foram cultivadas por 6 dias em a) meio de Treg completo (RPMI com FBS a 10%, 0,5 µg/ml anti-CD28, 100 U/ml de IL-2, 100 ng/ml de rapamicina), b) meio de Treg completo sem rapamicina, ou c) com 100 ng/ml de IL-15 (em RPMI com FBS a 10%, 0,5 µg/ml de anti-CD28; sem IL-2; sem rapamicina). 1 x 10^5 PBMCs marcadas com CFSE foram semeadas com a dose indicada de Tregs marcadas com violeta Tag-it no anti-CD3 ligado à placa (OKT3; 100 ng/ml). A proliferação de células T CD8+ e CD4+ foi determinada, os dados para a qual são retratados na Figura 124. Os dados mostram que as Tregs pré-tratadas com IL-15 apresentam capacidade supressora diminuída, sugerindo que a IL-15 converte as Tregs em um fenótipo menos imunossupressor.

[00576] Para investigar melhor esta observação, Tregs expandidas com rapamicina foram tratadas com fusão XENP22821 de IL-15/Rα-Fc (IL-15[N65D]; sequência retratada na Figura 120) por 14 dias e analisadas por citometria de fluxo. Surpreendentemente, os dados na Figura 125 que retratam a expressão de CD25 e FOXP3 em células CD4+ mostram que o tratamento com XENP22821 reduziu a expressão de FOXP3. Embora FOXP3 seja geralmente um marcador para Tregs, CD4+CD45RA- de FOXP3alto são as

eTreg verdadeiramente supressoras, enquanto CD4+CD45RA- de FOXP3baixo são células T CD4 efetoras ativadas não supressoras (Miyara et al. (2009) Delineamento funcional e dinâmica de diferenciação de células T CD4+ humanas expressando o fator de transcrição FoxP3. Immunity. 30 (6): 899 a 911). Os dados na Figura 126 que retratam a expressão de CD45RA e FOXP3 em células CD4+ mostram que o tratamento com XENP22821 muda as populações CD4+CD45RA- de FoxP3alto para FoxP3baixo, indicando que o tratamento com fusões de IL-15/Rα-Fc realmente mudou a população de eTreg (população reduzida de 5,24% para 2,72%) para células T CD4 efetoras ativadas (população aumentada de 18,2% para 28,6%).

[00577] Além disso, os dados na Figura 127 que retratam a expressão de CD25 e CCR4 em células CD4+ mostram que o tratamento com XENP22821 reduziu a expressão de CCR4. Foi relatado anteriormente que CCR4 está envolvido com a imunossupressão (Molinaro et al. (2015). A CCR4 controla os efeitos supressores das células T regulatórias em eventos precoces e tardios durante a sepse grave. PLoS One. 10 (7)).

[00578] Coletivamente, isso indica que, embora as fusões de IL-15/Rα-Fc (não direcionadas e direcionadas) expandam as populações Treg existentes, elas revertem a supressão da proliferação de células T efetoras expandindo Tregs em fenótipos não imunossupressores (por exemplo, FoxP3baixo e CCR4baixo/-).

B. 14C(B): AS FUSÕES DE IL-15/Rα-FC REVERTEM A SUPRESSÃO DE TGFß DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T

[00579] No ambiente tumoral, o TGFß é expresso tanto por células malignas quanto por células imunes (por exemplo, Tregs), e funciona para suprimir a proliferação de células T, resultando em resposta imune antitumoral suprimida (Teicher, BA. (2007) Transforming Growth Factor-ß and the Immune Response to Malignant Disease. Clin Cancer Res. 13 (21)).

[00580] Em um experimento para investigar a interação entre as fusões

de IL-15/Rα-Fc e TGFß, PBMCs marcadas com CFSE foram incubados com a dose indicada de TGFß1, com ou sem 10 µg/ml ilustrativa de fusão de IL-15/Rα-Fc XENP24045 em 100 ng/ml anti-CD3 ligado à placa (OKT3) por 4 dias a 37 ºC. Após 4 dias, as células foram analisadas por citometria de fluxo. A proliferação de células T foi medida por diluição de CFSE, os dados para a qual são retratados na Figura 128. Os dados mostram que TGFß suprime a proliferação de células T de maneira dependente da dose; no entanto, notavelmente, a fusão de IL-15/Rα-Fc previne a supressão de TGFß da proliferação de células T em todas as doses testadas.

[00581] Isso indica que outro mecanismo pelo qual as fusões IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 revertem a supressão da proliferação de células T é a reversão das ações supressivas de TGFß.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro monômero que compreende, do terminal N- ao C-:

i) uma proteína de domínio IL-15 Rα sushi;

ii) um primeiro ligante de domínio;

iii) uma proteína IL-15; e

iv) um primeiro domínio Fc variante; e

b) um segundo monômero que compreende uma cadeia pesada que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um segundo domínio Fc variante;

c) um terceiro monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL; em que os ditos domínios VH e VL formam um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

2. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito domínio VH é uma variante de SEQ ID NO: 5 que compreende a substituição de aminoácido F32L e o dito domínio VL é uma variante de SEQ ID NO: 6 que compreende N27dH.

3. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o dito domínio VL compreende ainda as substituições de aminoácidos K30Y/S93T.

4. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o dito VH é H1 e o dito VL é L1.1.

5. Proteína de fusão Fc heterodimérica IL-15/Rα direcionada

de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a dita proteína IL-15 é uma proteína IL-15 variante que compreende substituição (ou substituições) de aminoácido selecionada a partir do grupo de D30N/E64Q/N65D; D30N/N65D; N1D; N4D; D8N; D30N; D61N; E64Q; N65D; Q108E; N1D/N4D/D8N; N1D/N4D/N65D; N1D/D30N; N1D/D61N; N1D/D61N/E64Q/Q108E; N1D/E64Q; N1D/N65D; N1D/Q108E; N4D; N4D/D30N; N4D/D61N; N4D/D61N/N65D; N4D/D61N/E64Q/Q108E; N4D/E64Q; N4D/N65D; D8N/D61N; D8N/E64Q; D30N/E64Q; D30N/Q180E; D61N/E64Q/N65D; E64Q; E64Q/N65D; E64Q/Q108E; e N65D/Q108E.

6. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a dita proteína IL-15 variante compreende substituição (ou substituições) de aminoácido selecionada a partir do grupo de N4D/N65D; D30N; D30N/E64Q; D30N/N65D; e D30N/E64Q/N65D.

7. Proteína de fusão Fc heterodimérica IL-15/Rα direcionada de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro domínio Fc variante e os ditos segundos domínios Fc variantes compreendem substituições de aminoácidos L368D/K370S : LS364K/E357Q de acordo com a numeração EU.

8. Proteína de fusão Fc heterodimérica IL-15/Rα direcionada de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro domínio Fc variante e o dito segundo domínio Fc variante compreendem, cada um, substituições de aminoácidos M428L/N343S de acordo com a numeração EU.

9. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro monômero que compreende, do terminal N- ao C-:

i) uma proteína de domínio IL-15 Rα sushi;

ii) um primeiro ligante de domínio;

iii) uma proteína IL-15 variante;

iv) um segundo ligante de domínio; e

v) um primeiro domínio Fc variante que compreende CH2-CH3; e

b) um segundo monômero que compreende do terminal N- ao C-:

i) um domínio scFv;

ii) um terceiro ligante de domínio;

iii) um segundo domínio Fc variante que compreende CH2-CH3;

em que o dito domínio scFv compreende um primeiro domínio variável pesado, um ligante scFv e um primeiro domínio variável leve, em que o dito domínio scFv se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

10. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro monômero que compreende, do terminal N- ao C-:

i) uma proteína de domínio IL-15 Rα sushi;

ii) um primeiro ligante de domínio;

iii) um primeiro domínio Fc variante que compreende CH2-CH3;

b) um segundo monômero que compreende do terminal N- ao C-:

i) um domínio scFv;

ii) um terceiro ligante de domínio;

iii) um segundo domínio Fc variante que compreende CH2-

CH3;

em que o dito domínio scFv compreende um primeiro domínio variável pesado, um ligante scFv e um primeiro domínio variável leve e o dito domínio scFv liga PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe; e

c) um terceiro monômero que compreende uma proteína de domínio de IL-15 variante.

11. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro monômero que compreende uma cadeia pesada que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um primeiro domínio Fc variante;

b) um segundo monômero que compreende do terminal N- ao C-:

i) uma proteína de domínio IL-15 Rα sushi;

ii) um segundo ligante de domínio;

iii) um segundo domínio Fc variante que compreende CH2-CH3;

b) um terceiro monômero que compreende uma proteína de domínio de IL-15 variante;

c) um quarto monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL; em que os ditos domínios VH e VL formam um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

12. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro monômero que compreende uma cadeia pesada que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um primeiro domínio Fc variante;

b) um segundo monômero que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3-ligante de domínio-proteína de domínio sushi de IL-15Rα-ligante de domínio-proteína de domínio de IL-15 variante, em que o dito CH2-CH3 é um segundo domínio Fc variante;

c) um terceiro monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL;

em que os ditos domínios VH e VL formam um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

13. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro monômero que compreende uma cadeia pesada que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um primeiro domínio Fc variante;

b) um segundo monômero que compreende VH-CH1-dobradiça-CH2-CH3-ligante de domínio-proteína de domínio sushi de IL-15Rα-de domínio-proteína, em que o dito CH2-CH3 é um segundo domínio Fc variante;

c) um terceiro monômero que compreende uma proteína de domínio de IL-15 variante;

d) um quarto monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL;

em que os ditos domínios VH e VL se ligam ao PD-1 humano e não competem pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

14. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro monômero que compreende, do terminal N- ao C-: um VH-CH1-ligante de domínio de proteína de IL-15 de ligante de

domínio-proteína de domínio-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é uma primeira variante do domínio Fc;

b) um segundo monômero que compreende, do terminal N- ao C-: um VH-CH1-ligante de domínio-proteína de domínio sushi de IL-15Rα-ligante-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um segundo domínio Fc variante;

c) um terceiro monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL;

em que os ditos domínios VH e VL formam um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

15. Proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro monômero que compreende, de N- a C-terminal: um VH-CH1 -variante ligante de domínio-proteína de domínio sushi de IL-15Rα-ligante de domínio-proteína de domínio de IL-15 variante-CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um primeiro domínio Fc variante;

b) um segundo monômero que compreende uma cadeia pesada que compreende VH-CH1-dobradiça CH2-CH3, em que o dito CH2-CH3 é um segundo domínio Fc variante;

c) um terceiro monômero que compreende uma cadeia leve que compreende VL-CL;

em que os ditos domínios VH e VL formam um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao PD-1 humano e não compete pelo dito PD-1 humano com nivolumabe e/ou pembrolizumabe.

16. Composição de ácido nucleico caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro ácido nucleico que codifica o primeiro monômero, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e 9 a

15;

b) um segundo ácido nucleico que codifica o segundo monômero, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e 9 a 15; e

c) um terceiro ácido nucleico que codifica o terceiro monômero, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e 9 a 15; respectivamente.

17. Composição de vetor de expressão caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro vetor de expressão que compreende o primeiro ácido nucleico, conforme definido na reivindicação 16;

b) um segundo vetor de expressão que compreende o segundo ácido nucleico, conforme definido na reivindicação 16;

c) um terceiro vetor de expressão que compreende o terceiro ácido nucleico, conforme definido na reivindicação 16.

18. Célula hospedeira caracterizada pelo fato de que compreende a dita composição de vetor de expressão, conforme definido na reivindicação 17.

19. Método de produção da proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e 9 a 15, sendo que o método é caracterizado pelo fato de que compreende: cultivar a célula hospedeira, conforme definido na reivindicação A14, sob condições em que a dita proteína de fusão Fc heterodimérica de IL-15/Rα direcionada é expressa; e recuperar a dita proteína.

20. Método de tratamento de um câncer caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um paciente em necessidade de uma composição farmacêutica que compreende a proteína de fusão Fc heterodimérica IL-15/Rα direcionada, conforme definido em qualquer uma

das reivindicações 1 a 8 e 9 a 15.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-PD-1 é nivolumabe ou pembrolizumabe.

Figura 1A

sequência de precursor de IL-15 humana

>sp|P40933 (SEQ ID NO:1)
MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES
DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHI
VQMFINTS

sequência de forma madura de IL-15 humana

>sp|P40933|49-162 (SEQ ID NO:2)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN
GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

IL-15Rα humana, domínio extracelular

>sp|Q13261|31-205 (SEQ ID NO:3)
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPP
STVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWE
LTASASHQPPGVYPQGHSDTT

IL-15Rα humana, domínio de sushi

>sp|Q13261|31-95 (SEQ ID NO:4)
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

sequência de IL-15Rα humana

>sp|Q13261 (SEQ ID NO:12)
MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVL
NKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMP
SKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSR
QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL

sequência de IL-15Rß humana

>sp|P14784 (SEQ ID NO:13)
MAAPALSWRLPLLILLLPLATSWASAAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELL
PVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEI
SQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRT
KPAALGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPF
PSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYD
PYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQER
VPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSL
QELQGQDPTHLV

IL-15Rß humana, domínio extracelular

>sp|P14784|27-240 (SEQ ID NO:14)
AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI
VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE
APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDT

Figura 1B

sequência de cadeia gama comum humana

>sp|P31785 (SEQ ID NO:15)
MLKPSLPFTSLLFLQLPLLGVGLNTTILTPNGNEDTTADFFLTTMPTDSLSVSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSS
SEPQPTNLTLHYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLYQTFVVQLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIP
WAPENLTLHKLSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFNPLC
GSAQHWSEWSHPIHWGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFS
AWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET

cadeia gama comum humana, domínio extracelular

>sp|P31785|23-262 (SEQ ID NO:16)
LNTTILTPNGNEDTTADFFLTTMPTDSLSVSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLHYWYKNSDNDKV
QKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLYQTFVVQLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNN
RFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFNPLCGSAQHWSEWSHPIHWGSNTSKE
NPFLFALEA

Figura 2

sequência de PD-1 humano

>sp|Q15116 (SEQ ID NO:17)
MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTD
KLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTA
HPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWR
EKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

sequência de PD-1 humano, domínio extracelular

>sp|Q15116|21-170 (SEQ ID NO:18)
PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRV
TQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV

sequência de PD-1 de Macaca fascicularis

>tr|B0LAJ3 (SEQ ID NO:19)
MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLESPDRPWNAPTFSPALLLVTEGDNATFTCSFSNASESFVLNWYRMSPSNQTD
KLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTRLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTA
HPSPSPRPAGQFQALVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAAQGTIEARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWR
EKTPEPPAPCVPEQTEYATIVFPSGLGTSSPARRGSADGPRSPRPLRPEDGHCSWPL

sequência de PD-1 de Macaca fascicularis, domínio extracelular (previsto)

>tr|B0LAJ3|21-170 (SEQ ID NO:20)
PGWFLESPDRPWNAPTFSPALLLVTEGDNATFTCSFSNASESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRV
TRLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQALV

Figura 3A

Monômero 1	Monômero 2
F405A	T394F
S364D	Y349K
S364E	L368K
S364E	Y349K
S364F	K370G
S364H	Y349K
S364H	Y349T
S364Y	K370G
T411K	K370E
V397S/F405A	T394F
K370R/T411K	K370E/T411E
L351E/S364D	Y349K/L351K
L351E/S364E	Y349K/L351K
L351E/T366D	L351K/T366K
P395T/V397S/F405A	T394F
S364D/K370G	S364Y/K370R
S364D/T394F	Y349K/F405A
S364E/F405A	Y349K/T394F
S364E/F405S	Y349K/T394Y
S364E/T411E	Y349K/D401K
S364H/D401K	Y349T/T411E
S364H/F405A	Y349T/T394F
S364H/T394F	Y349T/F405A
Y349C/S364E	Y349K/S354C
L351E/S364D/F405A	Y349K/L351K/T394F
L351K/S364H/D401K	Y349T/L351E/T411E
S364E/T411E/F405A	Y349K/T394F/D401K
S364H/D401K/F405A	Y349T/T394F/T411E
S364H/F405A/T411E	Y349T/T394F/D401K

Figura 3B

Monômero 1	Monômero 2
K370E/T411D	T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R
Q347E/K360E	Q347R
L368E	S364K
L368E/K370S	S364K
L368E/K370T	S364K
L368E/D401R	S364K
L368E/D401N	S364K
L368E	E357S/S364K
L368E	S364K/K409E
L368E	S364K/K409V
L368D	S364K
L368D/K370S	S364K
L368D/K370S	S364K/E357L
L368D/K370S	S364K/E357Q
T411E/K360E/Q362E	D401K
K370S	S364K
L368E/K370S	S364K/E357Q
K370S	S364K/E357Q
T411E/K360D	D401K
T411E/K360E	D401K
T411E/Q362E	D401K
T411E/N390D	D401K
T411E	D401K/Q347K
T411E	D401K/Q347R
T411E/K360D/Q362E	D401K

Figura 3C

Monômero 1	Monômero 2
T411E/K360E/N390D	D401K
T411E/Q362E/N390D	D401K
T411E/Q347R	D401K/K360D
T411E/Q347R	D401K/K360E
T411E/K360	D401K/Q347K
T411E/K360D	D401K/Q347R
T411E/K360E	D401K/Q347K
T411E/K360E	D401K/Q347R
T411E/S364K	D401K/K370S
T411E/K370S	D401K/S364K
Q347E	E357Q
Q347E	E357Q/Q362K
K360D/Q362E	Q347R
K360D/Q362E	D401K
K360D/Q362E	Q347R/D401K
K360E/Q362E	Q347R
K360E/Q362E	D401K
K360E/Q362E	Q347R/D401K
Q362E/N390D	D401K
Q347E/K360D	D401N
K360D	Q347R/N390K
K360D	N390K/D401N
K360E	Y349H
K370S/Q347E	S364K
K370S/E357L	S364K
K370S/E357Q	S364K
K370S/Q347E/E357L	S364K
K370S/Q347E/E357Q	S364K

Figura 3D

Monômero 1	Monômero 2
L368D/K370S/Q347E	S364K
L368D/K370S/E357L	S364K
L368D/K370S/E357Q	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E	S364K
L368E/K370S/E357L	S364K
L368E/K370S/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368D/K370T/Q347E	S364K
L368D/K370T/E357L	S364K
L368D/K370T/E357Q	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E	S364K
L368E/K370T/E357L	S364K
L368E/K370T/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E/E357L	S364K
L368E/K370T/Q347E/E357Q	S364K
T411E/Q362E	D401K/T411K
T411E/N390D	D401K/T411K
T411E/Q362E	D401R/T411R
T411E/N390D	D401R/T411R
Y407T	T366Y
F405A	T394W
T366Y/F405A	T394W/Y407T
Y407A	T366W
T366S/L368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C

Figura 3E

Monômero 1	Monômero 2
K392D/K409D	E356K/D399K
K370D/K392D/K409D	E356K/E357K/D399K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	Q196K/I199T/N276K
K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	P217R/P228R/N276K
K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	N276K
N384S/K392N/V397M/Q419E	N276K
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/L368E	C220R/E224R/P228R/K409R
F405L	K409R
T366I/K392M/T394W	F405A/Y407V
T366V/K409F	L351Y/Y407A
T366A/K392E/K409F/T411E	D399R/S400R/Y407A
L351K	L351E
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447_	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447_	Q196K/I199T/N276K
K247Q/R355Q/Q419E/K447_	P217R/P228R/N276K
K247Q/R355Q/Q419E/K447_	N276K
I199T/N203D/K274Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	
N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D	
N208D/Q295E/Q418E/N421D	
Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K	
Q196K/I199T/N276K	
K274Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	
Q295E/N384D/Q418E/N421D	
Q295E/Q418E/N421D	
P217R/P228R/N276K	
N276K	
E269Q/E272Q/E283Q/E357Q	
E269Q/E272Q/E283Q	
E269Q/E272Q	
E269Q/E283Q	
E272Q/E283Q	
E269Q	

Figura 4

Região constante de variante	Substituições
pI_ISO(-)	I199T/N203D/K274Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_
pI_ISO(-)-Fc apenas	K274Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_
pI_(-)_isostérico A	N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D
pI_(-)_isostérico A apenas	Q295E/N384D/Q418E/N421D
pI_(-)_isostérico_B	N208D/Q295E/Q418E/N421D
pI_(-)_isostérico_B-Fc apenas	Q295E/Q418E/N421D
pI_ISO(+RR)	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
pI_ISO(+RR)-Fc apenas	P217R/P228R/N276K
pI_ISO(+)	Q196K/I199T/N276K
pI_ISO(+)-Fc apenas	N276K
pI_(+)_isostérico_A	E269Q/E272Q/E283Q/E357Q
pI_(+)_isostérico_B	E269Q/E272Q/E283Q
pI_(+)_isostérico_E269Q/E272Q	E269Q/E272Q
pI_(+)_isostérico_E269Q/E283Q	E269Q/E283Q
pI_(+)_isostérico_E272Q/E283Q	E272Q/E283Q
pI_(+)_isostérico_E269Q	E269Q

Figura 5

Variantes de ablação

G236R
S239G
S239K
S239Q
S239R
V266D
S267K
S267R
H268K
E269R
299R
299K
K322A
A327G
A327L
A327N
A327Q
L328E
P329K
A330L
A330S/P331S
I332K
I332R
V266D/A327Q
V266D/P329K
S267R/A327Q
S267R/P329K
G236R/L328R
E233P/L234V/L235A/G236_/S239K
E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
E233P/L234V/L235A/G236_/S239K/A327G
E233P/L234V/L235A/G236_/S267K/A327G
E233P/L234V/L235A/G236_
S239K/S267K
267K/P329K

Figura 6A

monômero (-) de IL-15-Fc	monômero (+) de IL-15Rα(sushi)-Fc
C220S	C220S
Variantes de pI de heterodímero L368D/K370S	Variantes de pI de heterodímero S364K/E357Q
Substituições de pI isostérico Q295E/N384D/Q418E/N421D	
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 6B

monômero (-) de scIL-15/Rα-Fc	monômero (+) de Fc vazio
C220S	C220S
Variantes de pI de heterodímero L368D/K370S	Variantes de pI de heterodímero S364K/E357Q
Substituições de pI isostérico Q295E/N384D/Q418E/N421D	
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 6C

monômero (-) de Fc vazio	monômero (+) de IL-15Rα (sushi)-Fc
C220S	C220S
Variantes de pI de heterodímero L368D/K370S	Variantes de pI de heterodímero S364K/E357Q
Substituições de pI isostérico Q295E/N384D/Q418E/N421D	
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 6D

Cadeia 1 de IL-15Rα(sushi)-Fc	Cadeia 2 de IL-15Rα (sushi)-Fc
C220S	C220S
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 6E

Fc-IL-15Rα(sushi) (-)	monômero (+) de IL-15Rα(sushi)-Fc
C220S	C220S
Variantes de pI de heterodímero L368D/K370S	Variantes de pI de heterodímero S364K/E357Q
	Substituições de pI isostérico P217R/P228R/N276K
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 7A

monômero (-) de sclL-15/Rα-Fc	monômero (+) de scFv-Fc
C220S	C220S
Variantes de pl de heterodímero L368D/K370S	Variantes de pl de heterodímero S364K/E357Q
Substituições de pl isostérico Q295E/N384D/Q418E/N421D	
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 7B

monômero (-) de scFv-Fc	monômero (+) de IL-15Rα(sushi)-Fc
C220S	C220S
Variantes de pl de heterodímero L368D/K370S	Variantes de pl de heterodímero S364K/E357Q
Substituições de pl isostérico Q295E/N384D/Q418E/N421D	
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 7C

monômero (-) de sclL-15/Rα-Fc	Cadeia Pesada (+)
C220S	
Variantes de pl de heterodímero L368D/K370S	Variantes de pl de heterodímero S364K/E357Q
Substituições de pl isostérico Q295E/N384D/Q418E/N421D	
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 7D

Cadeia Pesada (-)	monômero (+) de IL-15Rα(sushi)-Fc
	C220S
Variantes de pl de heterodímero L368D/K370S	Variantes de pl de heterodímero S364K/E357Q
Substituições de pl isostérico N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D	
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 7E

Cadeia Pesada-IL-15Rα(sushi) (-)	**Cadeia Pesada (+)**
Variantes de pI de heterodímero L368D/K370S	Variantes de pI de heterodímero S364K/E357Q
Substituições de pI isostérico N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D	Substituições de pI isostérico Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 7F

Cadeia Pesada (-)	**Cadeia Pesada-IL-15Rα(sushi) (+)**
Variantes de pI de heterodímero L368D/K370S	Variantes de pI de heterodímero S364K/E357Q
Substituições de pI isostérico N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D	Substituições de pI isostérico Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

Figura 8

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
$(GGGGS)_1$ ou GGGGS	GGGGS	10
$(GGGGS)_2$	GGGGSGGGGS	21
$(GGGGS)_3$	GGGGSGGGGSGGGGS	22
$(GGGGS)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	23
$(GGGGS)_5$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	24
$(GGGGS)_6$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	25
$(GGGGS)_7$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	26
30AA-ligante	DPALVHQRPAPPGGGGSGGGGSGGGGSGGG	27
$(GKPGS)_1$ ou GKPGS	GKPGS	28
$(GKPGS)_5$	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	29
$(GKPGS)_6$	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	30
$(GGGES)_1$ ou GGGES	GGGES	31

Figura 9A

Ligantes de scFv de carga positiva

Nome	Sequência	Comprimento	Carga	SEQ ID NO:
Gly-Ser 15	GGGGSGGGGSGGGGS	15	0	22
Ligante Whitlow	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	18	+1	32
6paxA_1 (+A)	IRPRAIGGSKPRVA	14	+4	33
+B	GKGGSGKGGSGKGGS	15	+3	34
+C	GGKGSGGKGSGGKGS	15	+3	35
+D	GGGKSGGGKSGGGKS	15	+3	36
+E	GKGKSGKGKSGKGKS	15	+6	37
+F	GGGKSGGKGSGKGGS	15	+3	38
+G	GKPGSGKPGSGKPGS	15	+3	39
+H	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	20	+4	40
+I	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	20	+8	41

Figura 9B

Ligantes de scFv de carga negativa

Nome	Sequência	Comprimento	Carga	SEQ ID NO:
Gly-Ser 20	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	20	0	23
3hsc_2 (-A)	STAGDTHLGGEDFD	14	-4	42
-B	GEGGSGEGGSGEGGS	15	-3	43
-C	GGEGSGGEGSGGEGS	15	-3	44
-D	GGGESGGGESGGGES	15	-3	45
-E	GEGESGEGESGEGES	15	-6	46
-F	GGGESGGEGSGEGGS	15	-3	47
-G	GEGESGEGESGEGESGEGES	20	-8	48

Figura 9C

Ligantes de scFv adicionais

GGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO:22
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO:23
GSTSGSGKPGSGEGSTKG	SEQ ID NO:32
PRGASKSGSASQTGSAPGS	SEQ ID NO:49
GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	SEQ ID NO:50
GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	SEQ ID NO:51
GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	SEQ ID NO:40

Figura 10A

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 3

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 52)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 53)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVS
GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 2

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 54)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 55)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVS
GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

estrutura principal de IL-15/Rg-Fc 3

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 56)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 57)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCEVS
GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 4

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 58)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSKGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 59)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTENEVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLEVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 10B

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 5

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 60)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDQLTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 61)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCDVS
GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 6

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 62)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 63)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVS
GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 7

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 64)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 65)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVS
GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 8

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 66)
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEQMTKNQVKLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 67)
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEE
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGF
YPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWEEGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Figura 10C

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 9

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 68)
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 69)
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEF
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFY
PSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 10

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 70)
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 71)
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEF
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFY
PSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 11

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 72)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 73)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVS
GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 12

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 74)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 75)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 10D

Estrutura principal de IL-15/Rα-Fc 13

monômero de >IL-15/Rα-Fc 1 (SEQ ID NO: 76)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVS
GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

monômero de >IL-15/Rα-Fc 2 (SEQ ID NO: 77)

ERKSSDKTHTCPRCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFKWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 11

estrutura principal de IL-15/Rα x anti-PD-1 1

>Cadeia 1 (SEQ ID NO: 78)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Cadeia 2 (SEQ ID NO: 79)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

estrutura principal de IL-15/Rα x anti-PD-1 2

>Cadeia 1 (SEQ ID NO: 80)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Cadeia 2 (SEQ ID NO: 81)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

estrutura principal de IL-15/Rα x anti-PD-1 3

>Cadeia 1 (SEQ ID NO: 82)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Cadeia 2 (SEQ ID NO: 83)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVNHKPSNTK
VDKKVERKSCDKTHTCPRCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 12

Cadeia Leve Constante - Kappa (SEQ ID NO: 84)

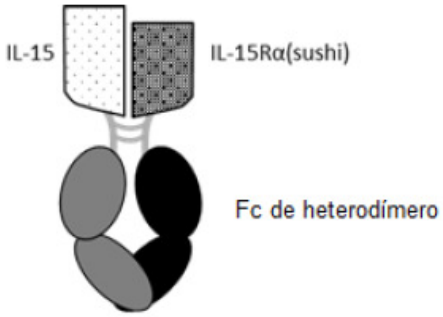
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

Cadeia Leve Constante - Lambda (SEQ ID NO: 85)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE
QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Figura 13A

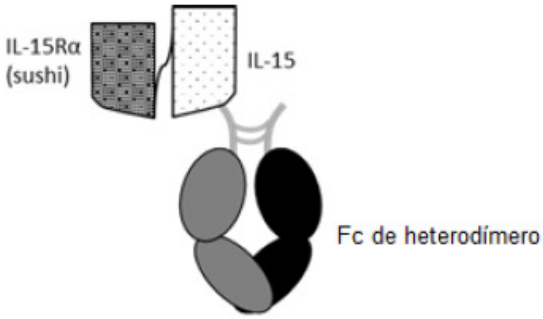
A)



IL-15/Rα-heteroFc

Figura 13B

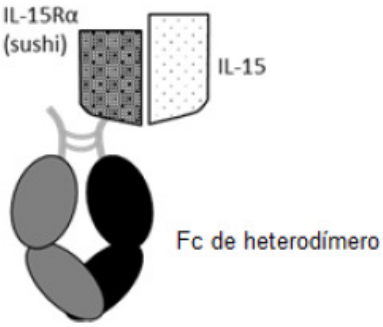
B)



scIL-15/Rα-Fc

Figura 13C

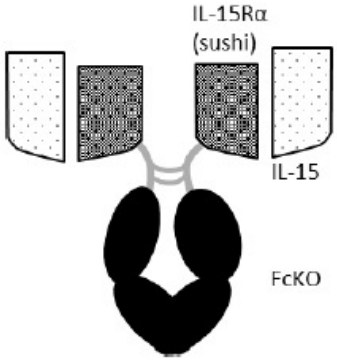
C)



ncIL-15/Rα-Fc

Figura 13D

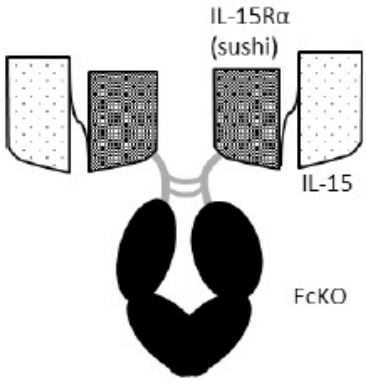
D)



scIL-15/Rα-Fc bivalente

Figura 13E

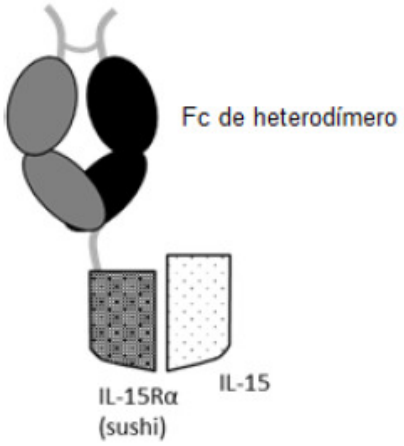
E)



15/Rα-Fc bivalente

Figura 13F

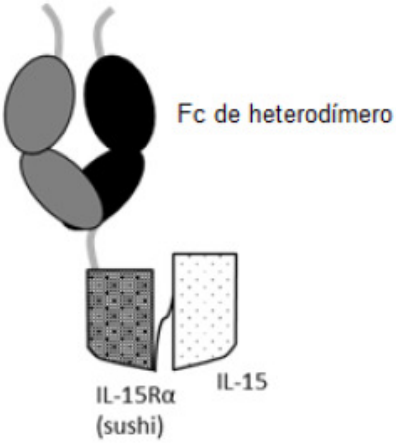
F)



Fc-ncIL-15/Rα

Figura 13G

G)



Fc-scIL-15/Rα

Figura 14

>XENP20818 -IL15 humana-(GGGGS)1 x IL15Rα humana (Sushi)-(GGGGS)1 heterodímero de Fc (SEQ ID NO: 86)

Cadeia 1 - human_IL15_(GGGGS)$_1$_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN
GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - human_IL15Rα(Sushi)_(GGGGS)$_1$_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 87)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGS/EPKSS
DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>XENP22853 human_IL15_(GGGGS)1-human_IL15Ra(Sushi)_(GGGGS)1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia XENP22853 1 - human_IL15_(GGGGS)1-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 88)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN
GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP22853 2 - human_IL15Ra(Sushi)_(GGGGS)1-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 89)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGS/EPKSS
DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Figura 15

IL15Rα(Sushi)-(GGGGS)$_6$ humana- IL15(cadeia única) humana heterodímero de Fc

Cadeia 1 - human_IL15Rα(sushi)_(GGGGS)$_6$-human_IL15-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (16478) (SEQ ID NO: 90)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDA
SIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - empty-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (8924) (SEQ ID NO: 91)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>XENP021993 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(single-chain)-empty-Fc_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 92)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 – empty_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 93)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 16

>XENP21479 – heterodímero de Fc de Fc-IL15(não covalente) vazio-IL15Rα humana (Sushi)

Cadeia 1 - human_IL15_no_tag (16484) (SEQ ID NO: 94)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN
GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

Cadeia 2 - empty-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (8793) (SEQ ID NO: 95)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVS
GFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - human_IL15Rα(Sushi)-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (16481) (SEQ ID NO: 96)
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/EPKSSDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 17A

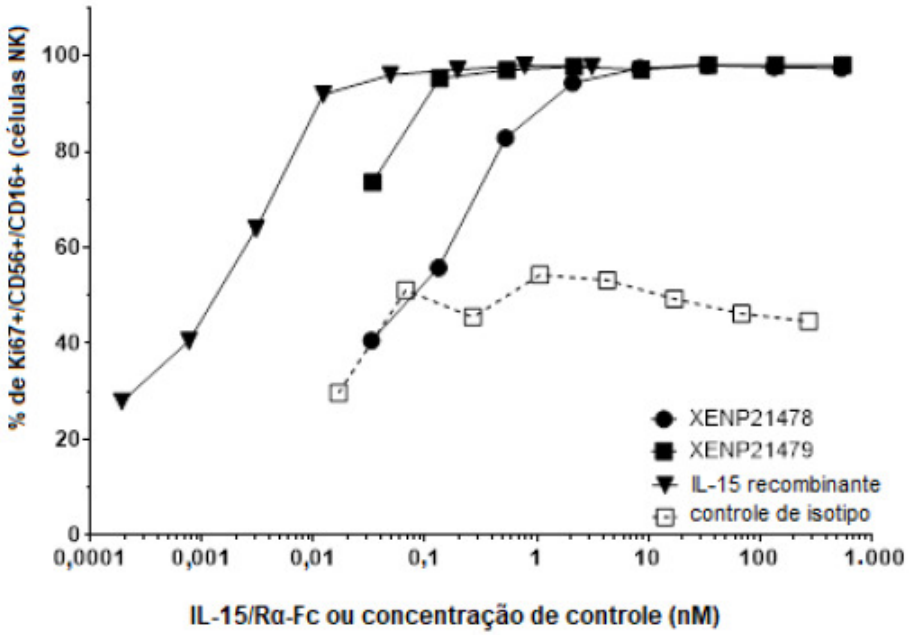


Figura 17B

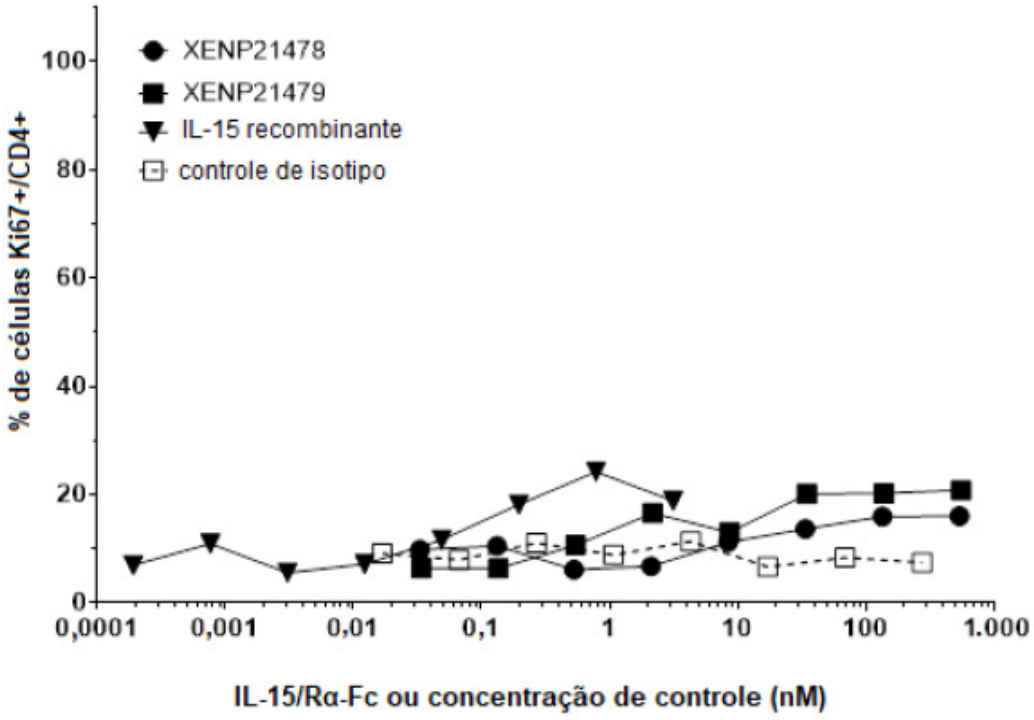


Figura 17C

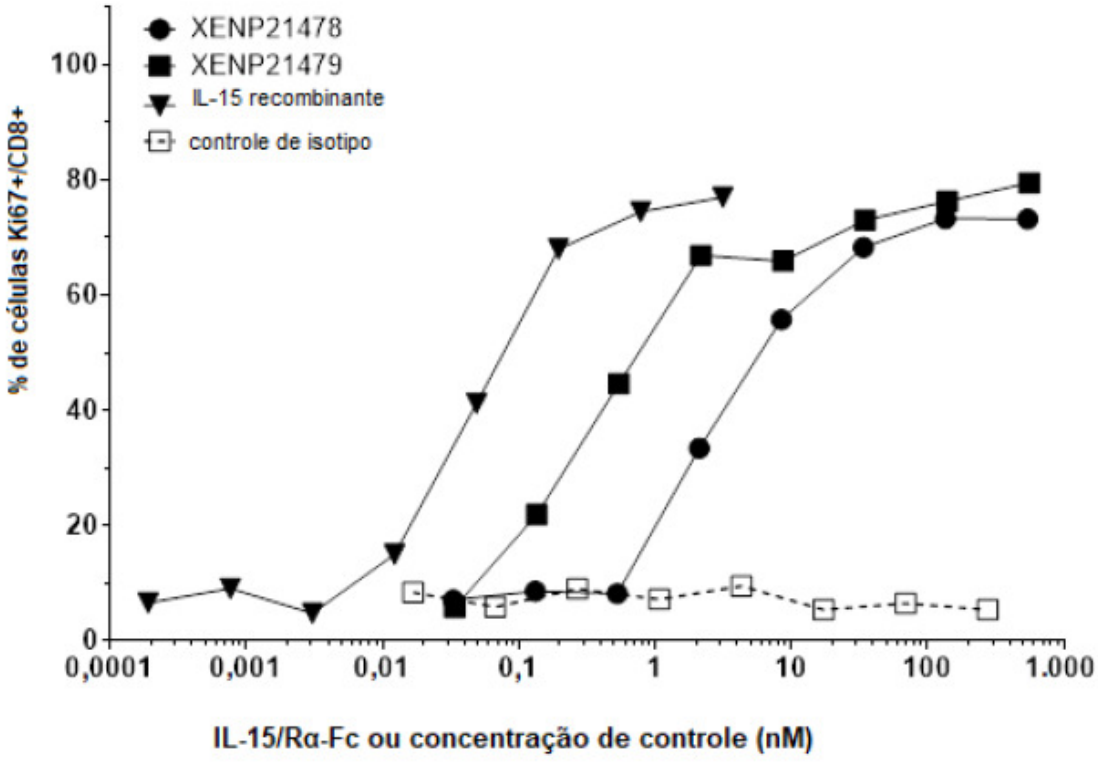

XENP21478
XENP21479
IL-15 recombinante
controle de isotipo
% de células Ki67+/CD8+
100
80
60
40
20
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1.000
IL-15/Rα-Fc ou concentração de controle (nM)

Figura 18

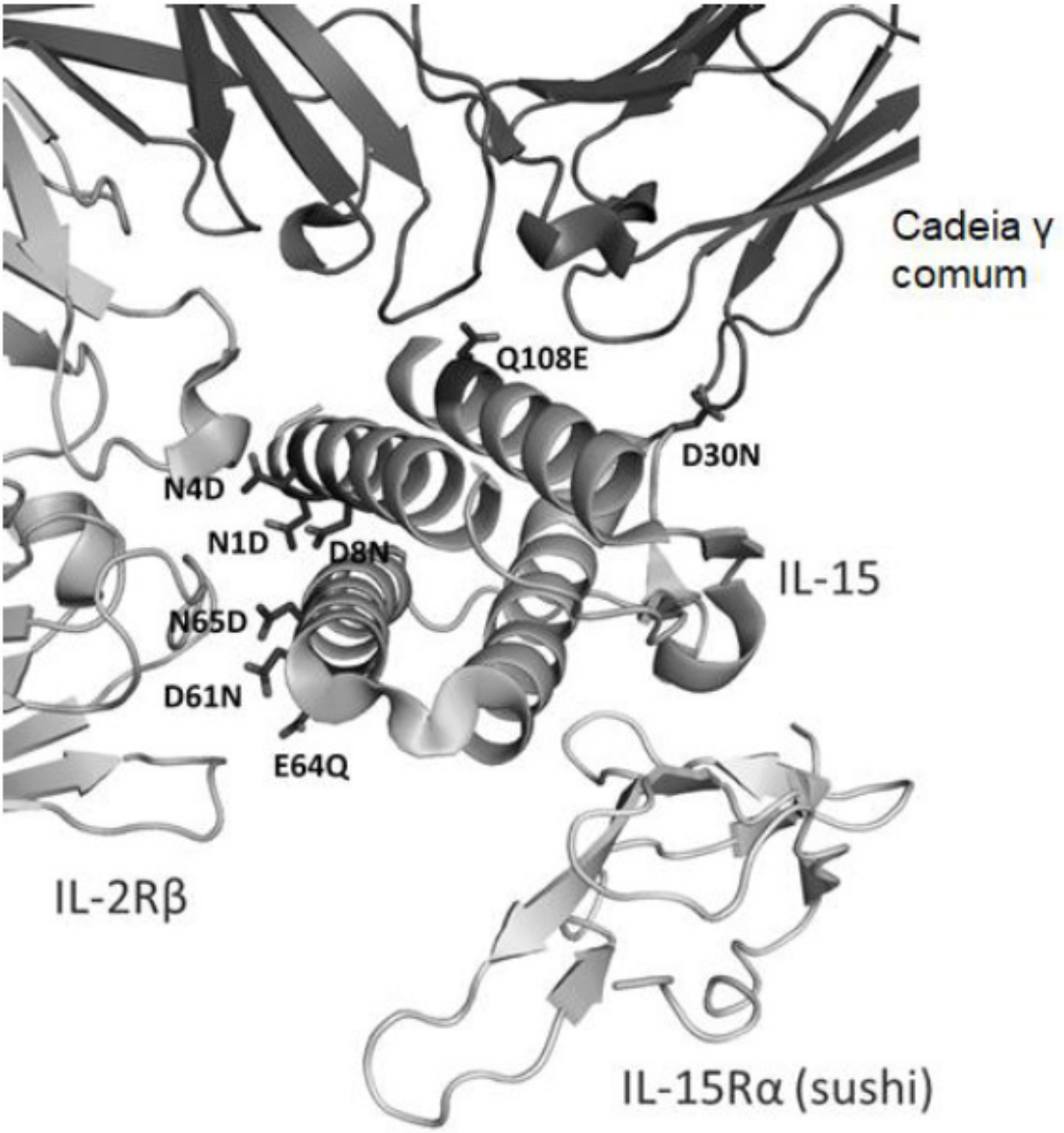

Cadeia γ comum
Q108E
D30N
N4D
N1D
D8N
IL-15
N65D
D61N
E64Q
IL-2Rβ
IL-15Rα (sushi)

Figura 19A

N1D (SEQ ID NO: 97)
DWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

N4D (SEQ ID NO: 98)
NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

D8N (SEQ ID NO: 99)
NWVNVISNLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

D30N (SEQ ID NO: 100)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

D61N (SEQ ID NO: 101)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHNTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

E64Q (SEQ ID NO: 102)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

N65D (SEQ ID NO: 103)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

Q108E (SEQ ID NO: 104)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVEMFINTS

N1D/D61N (SEQ ID NO: 105)
DWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHNTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

N1D/E64Q (SEQ ID NO: 106)
DWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

N4D/D61N (SEQ ID NO: 107)
NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHNTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

N4D/E64Q (SEQ ID NO: 108)
NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

Figura 19B

D8N/D61N (SEQ ID NO: 109)
NWVNVISNLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHNTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

D8N/E64Q (SEQ ID NO: 110)
NWVNVISNLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

D61N/E64Q (SEQ ID NO: 111)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHNTVQNLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

E64Q/Q108E (SEQ ID NO: 112)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVEMFINTS

N1D/N4D/D8N (SEQ ID NO: 113)
DWVDVISNLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

D61N/E64Q/N65D (SEQ ID NO: 114)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHNTVQDLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

N1D/D61N/E64Q/Q108E (SEQ ID NO: 115)
DWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHNTVQNLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVEMFINTS

N4D/D61N/E64Q/Q108E (SEQ ID NO: 116)
NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHNTVQNLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVEMFINTS

N1D/N65D (SEQ ID NO: 117)
DWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

N1D/Q108E (SEQ ID NO: 118)
DWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVEMFINTS

N4D/N65D (SEQ ID NO: 119)
NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

N1D/D30N (SEQ ID NO: 120)
DWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILA
NNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

Figura 19C

N4D/D30N (SEQ ID NO: 121)
NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILA
NNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

D30N/E64Q (SEQ ID NO: 122)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQNLIILA
NNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

D30N/N65D (SEQ ID NO: 123)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

D30N/Q108E (SEQ ID NO: 124)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVEMFINTS

N65D/Q108E (SEQ ID NO: 125)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVEMFINTS

E64Q/N65D (SEQ ID NO: 126)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

N1D/N4D/N65D (SEQ ID NO: 127)
DWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

D30N/E64Q/N65D (SEQ ID NO: 128)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

N4D/D61N/N65D (SEQ ID NO: 129)
NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHNTVEDLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

Figura 20

>XENP24113 human_IL15_N4D/N65D_(GGGGS)1-human_IL15Ra(Sushi)_(GGGGS)1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia XENP24113 1 - human_IL15_N4D/N65D_(GGGGS)1-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 130)

NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSN
GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP24113 2 - human_IL15Ra(Sushi)_(GGGGS)1-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 131)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGS/EPKSS
DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

>XENP24306 human_IL15_D30N/E64Q/N65D_(GGGGS)1-human_IL15Ra(Sushi)_(GGGGS)1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia XENP24306 1 - human_IL15_D30N/E64Q/N65D_(GGGGS)1-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 132)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSN
GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP24306 2 - human_IL15Ra(Sushi)_(GGGGS)1-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 133)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGS/EPKSS
DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Figura 21A

>XENP29281 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15_D30N_(single-Chain)-empty-Fc_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia XENP29281 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15_D30N_(single-Chain)-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 134)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP29281 2 - empty-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 135)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>XENP24050 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15_N4D/N65D_(single-Chain)-empty-Fc_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia XENP24050 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15_N4D/N65D_(single-Chain)-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 136)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGS/NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP24050 2 - empty-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 137)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>XENP24294 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15_N4D/N65D_(single-Chain)-empty-Fc_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia XENP24294 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15_N4D/N65D_(single-Chain)-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 138)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGS/NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP24294 2 - empty-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 139)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Figura 21B

>XENP29285 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15_D30N/N65D_(single-Chain)-empty-Fc_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia XENP29285 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15_D30N/N65D_(single-Chain)-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 140)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP29285 2 - empty-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 141)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>XENP29286 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15_D30N/E64Q/N65D_(single-Chain)-empty-Fc_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia XENP29286 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15_D30N/E64Q/N65D_(single-Chain)-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 142)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP29286 2 - empty-Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 143)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 22A

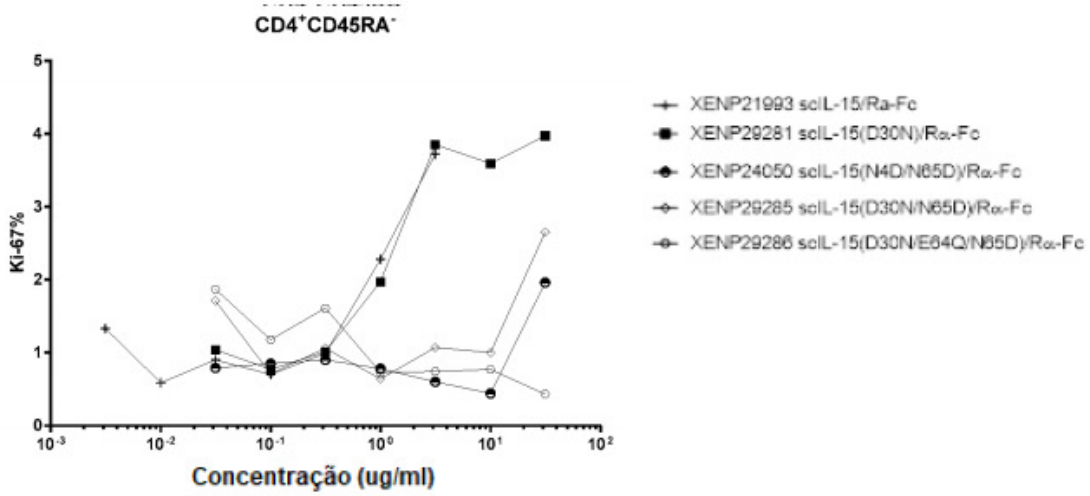


Figura 22B

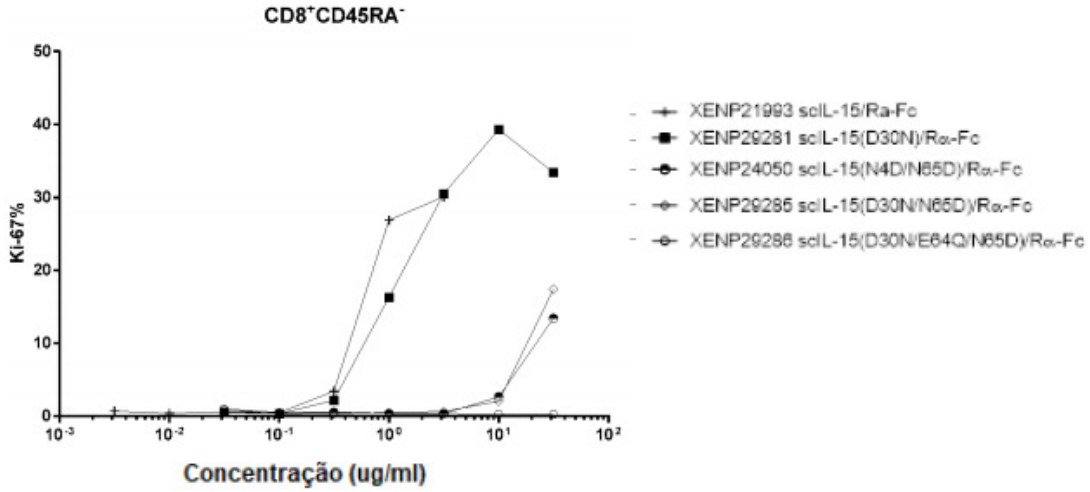


Figura 23

>XENP015074 Numax IgG1 PVA /S267K

Cadeia Pesada de XENP015074 Numax_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 144)
QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKHYNPSLKDRLTISKDTSK
NQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDVWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia Leve de XENP015074 Numax_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 145)
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSRVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL
QPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 24

A) XENP016432 Nivolumab_H0L0_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia Pesada de XENP016432 Nivolumab_H0L0_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 146)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKN
TLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia Leve de XENP016432 Nivolumab_H0L0_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 147)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS
LEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

B) XENP021461 Pembrolizumab_H0L0_IgG4_S228P

Cadeia Pesada de XENP021461 Pembrolizumab_H0L0_IgG4_S228P (SEQ ID NO: 148)

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTT
TAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Cadeia Leve de XENP021461 Pembrolizumab_H0L0_IgG4_S228P (SEQ ID NO: 149)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTL
TISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

C) XENP28437 Pembrolizumab_H0L0_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia XENP28437 1 - Cadeia Pesada de Pembrolizumab_H0_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 150)

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTT
TAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP28437 2 - Cadeia Leve de Pembrolizumab_L0 (SEQ ID NO: 151)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTL
TISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 25

> Cadeia Pesada de XENP021575 1C11[PD-1]_H0L0_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 152)
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCRASGYTFTHYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTAT
YFCARDYYGSSPYWGQGTTLTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Cadeia Leve de XENP021575 1C11[PD-1]_H0L0_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 153)
DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC
FQGSHVPNTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> Cadeia Pesada de XENP022553 1C11[PD-1]_H3L3_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 154)
QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADGFTGRFVFSLDTSVS
TAYLQISSLKAEDTAVYFCARDYYGSSPYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Cadeia Leve de XENP022553 1C11[PD-1]_H3L3_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 155)
DVLMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT
LTISSLQAEDVAVYYCFQGSHVPNTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 26

>XENP28519 mAb A[PD-1]_H1L1_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia XENP28519 1 - Cadeia Pesada de mAb A[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 156)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSITSDYAWNWIRQPPGKKLEWIGYISYSGYTTYNPSLKSRVTISRDTSKN
QFSLKLSSVTAADTAVYFCARDLDYGPWFAYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP28519 2 - Cadeia Leve de mAb A[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 157)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIHNYLAWYQQKPGKSPKLLVYNVKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS
LQPEDFATYYCQHFWSSPWTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP28686 mAb B[PD-1]_H1L1_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia XENP28686 1 - Cadeia Pesada de mAb B[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 158)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNFYIHWVRQAPGQSIEWMGSIYPNYGDTAYNQKFQGRVTMTVDKSIS
TAYMELSRLRSDDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP28686 2 - Cadeia Leve de mAb B[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 159)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISGDLNWYQQKPGKTVKLLIYHTSSLHSGVPLRFSGSGSGTDYTLTISS
LQPEDFATYYCQYYSKDLLTFGAGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 27

	XENP16432	XENP21461	mAb à base de 1C11	chmAb A	chmAb B	PDL1-Fc
XENP16432	0,0468	0,0143	0,2899	0,9692	0,9299	0,1582
XENP21461	0,0816	0,0301	0,405	0,8851	0,8542	0,1585
mAb à base de 1C11	-0,068	0,392	0,0987	0,8468	0,098	-0,0232
chmAb A	1,0095	1,0145	0,9657	0,0141	0,0157	0,5737
chmAb B	0,8889	0,9079	0,253	0,0372	0,0372	0,2058
HBS-EP	1	1	1	1	1	1
PDL1-Fc	0,5418	0,5045	0,6211	0,9274	0,9142	0,3162

Figura 28A

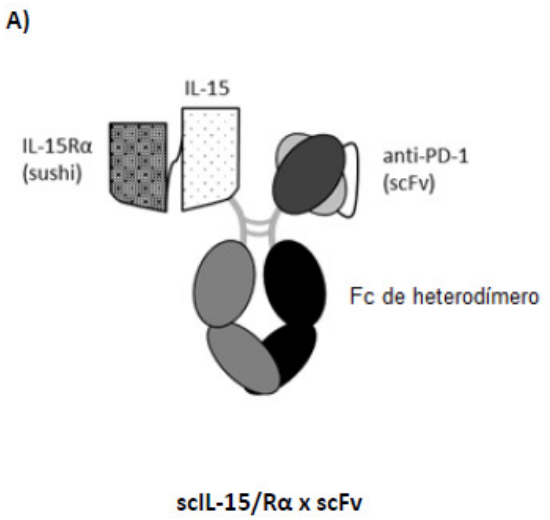


Figura 28B

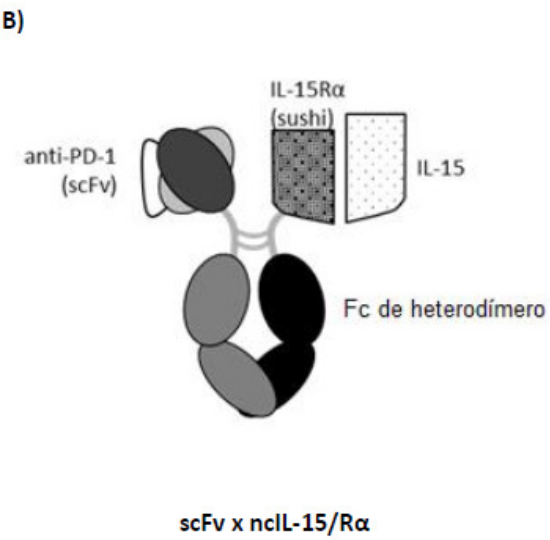


Figura 28C

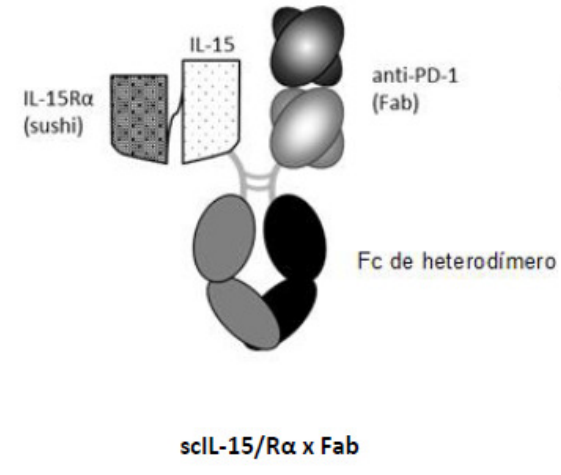


Figura 28D

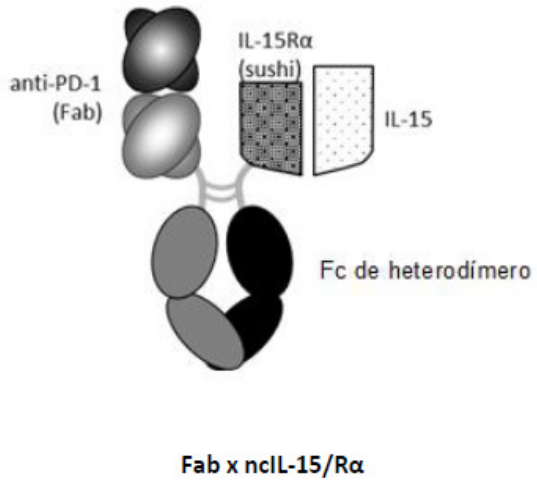
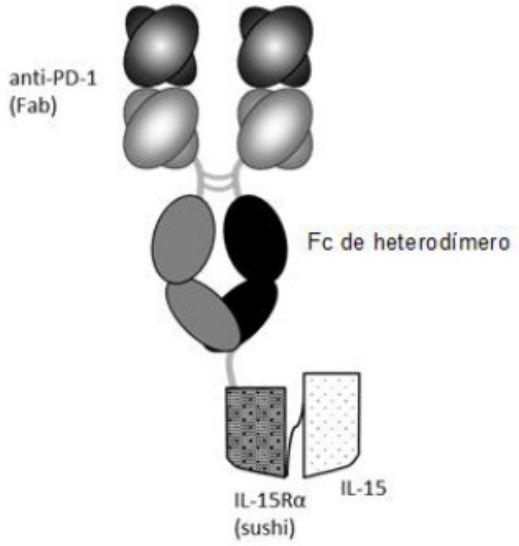


Figura 28E

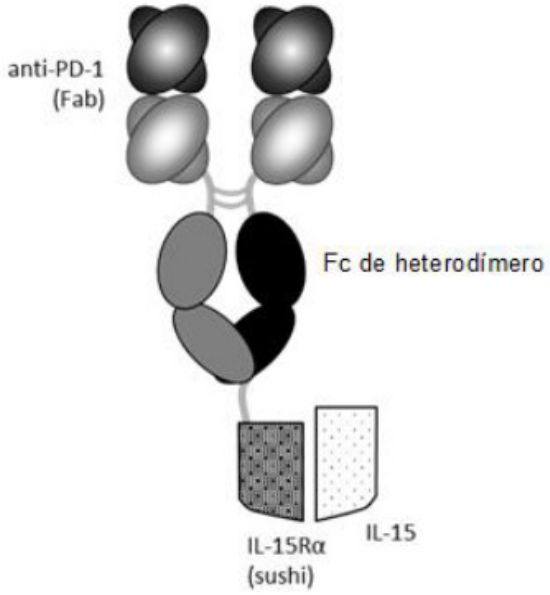
E)



mAb-scIL-15/Rα

Figura 28F

F)

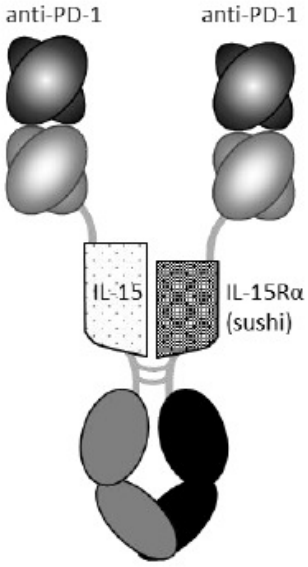


Exemplo: XENP22642

mAb-ncIL-15/Rα

Figura 28G

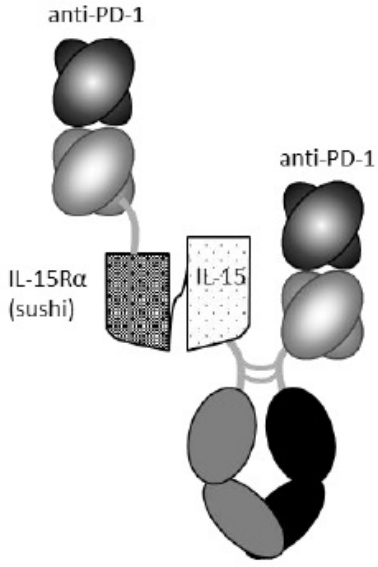
G)



IL-15/Rα central-

Figura 28H

H)



scIL-15/Rα central-

Figura 29

XENP025850human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-1C11[PD-1]_H3L3_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - 1C11[PD-1]_H3L3_ IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 160)

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARDYYGSSPY
WGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2-human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_ Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 161)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVDVISDLKKIED
*LIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/*EPKSS
DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3-1C11[PD-1]_L3 (SEQ ID NO: 162)

DVLMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQGSHVPNTFGGG
TKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

>XENP025937 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)-1C11[PD-1]_H3L3_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia 1 - XENP025937 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 163)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV
*TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/*EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - XENP025937 1C11[PD-1]_H3L3_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 164)

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSL
KAEDTAVYFCARDYYGSSPYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHE
ALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - XENP025937 1C11[PD-1]_L3 (SEQ ID NO: 165)

DVLMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE
DVAVYYCFQGSHVPNTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 30

>XENP28532 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)-mAb A[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia XENP28532 1 - Cadeia human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S scIL-15/Rα-Fc (SEQ ID NO: 166)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS*/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP28532 2 - Cadeia Pesada de mAb A[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 167)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSITSDYAWNWIRQPPGKKLEWIGYISYSGYTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARDLDYGPWFAYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP28532 3 - Cadeia Leve de mAb A[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 168)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIHNYLAWYQQKPGKSPKLLVYNVKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWSSPWTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP28692 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)-mAb B[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia XENP28692 1 - Cadeia human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S scIL-15/Rα-Fc (SEQ ID NO: 169)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS*/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP28692 2 - Cadeia Pesada de mAb B[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 170)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNFYIHWVRQAPGQSIEWMGSIYPNYGDTAYNQKFQGRVTMTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 31A

Cadeia XENP28692 3 - Cadeia Leve de mAb B[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 171)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISGDLNWYQQKPGKTVKLLIYHTSSLHSGVPLRFSGSGSGTDYTLTISS
LQPEDFATYYCQYYSKDLLTFGAGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30455 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)-mAb A[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 172)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VQDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb A[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 173)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSITSDYAWNWIRQPPGKKLEWIGYISYSGYTTYNPSLKSRVTISRDTSKN
QFSLKLSSVTAADTAVYFCARDLDYGPWFAYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb A[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 174)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIHNYLAWYQQKPGKSPKLLVYNVKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS
LQPEDFATYYCQHFWSSPWTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP29440 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)-mAb A[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia XENP29440 1 - Cadeia human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S scIL-15/Rα-Fc (SEQ ID NO: 175)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGS*/NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT*
VEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Figura 31B

Cadeia XENP29440 2 - Cadeia Pesada de mAb A[PD-1]_H1L1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 176)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSITSDYAWNWIRQPPGKKLEWIGYISYSGYTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLK
LSSVTAADTAVYFCARDLDYGPWFAYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP29440 3 - Cadeia Leve de mAb A[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 177)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIHNYLAWYQQKPGKSPKLLVYNVKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS
LQPEDFATYYCQHFWSSPWTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP29441 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)-mAb B[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia XENP29441 1 - Cadeia human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S scIL-15/Rα-Fc (SEQ ID NO: 178)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS*/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP29441 2 - Cadeia Pesada de mAb B[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 179)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNFYIHWVRQAPGQSIEWMGSIYPNYGDTAYNQKFQGRVTMTVDKSISTAYMELSRL
RSDDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHE
ALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP29441 3 - Cadeia Leve de mAb B[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 180)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISGDLNWYQQKPGKTVKLLIYHTSSLHSGVPLRFSGSGSGTDYTLTISS
LQPEDFATYYCQYYSKDLLTFGAGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 31C

>XENP26007 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)-Numax_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia XENP26007 1 - Cadeia human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-Chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S scIL-15/Rα-Fc (SEQ ID NO: 181)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP26007 2 - Cadeia Pesada de Numax_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 182)

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKHYNPSLKDRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDVWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP26007 3 - Cadeia Leve de Numax (SEQ ID NO: 183)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSRVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30432 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)-Numax_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 184)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - Numax_VH_IgG1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 185)

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKHYNPSLKDRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDVWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 31D

Cadeia 3 - Numax LC (SEQ ID NO: 186)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSRVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL
QPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP29481 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-Numax_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 187)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - Numax_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 188)

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKHYNPSLKDRLTISKDTSK
NQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDVWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - Numax LC (SEQ ID NO: 189)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSRVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL
QPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 32A

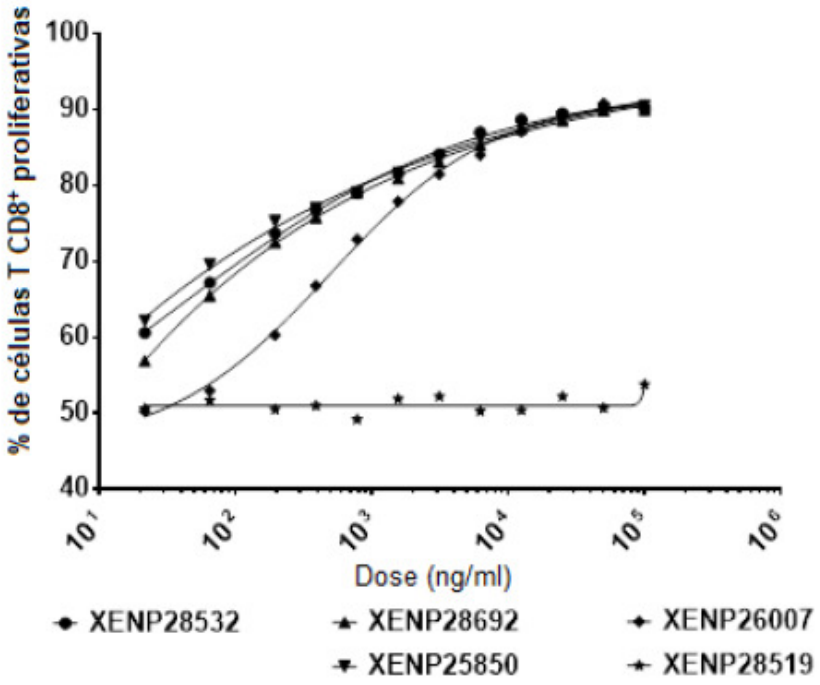


Figura 32B

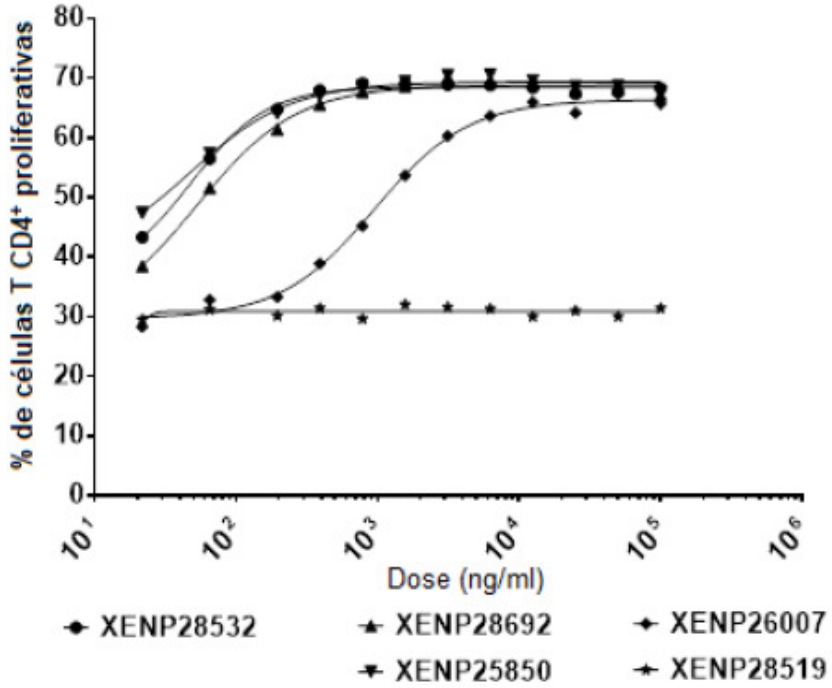


Figura 33A

A)

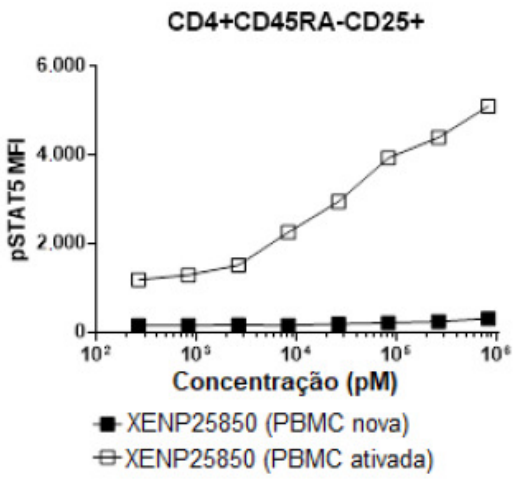


Figura 33B

B)

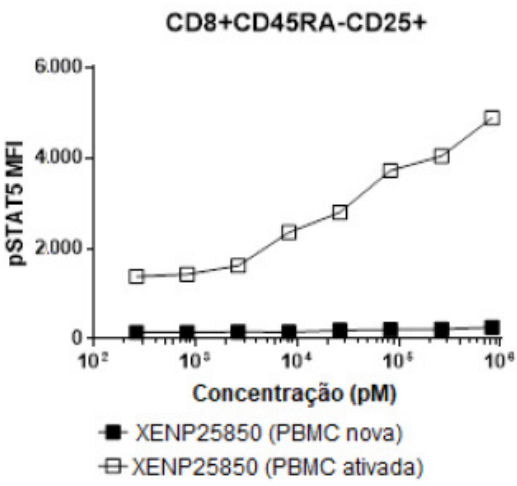


Figura 34A

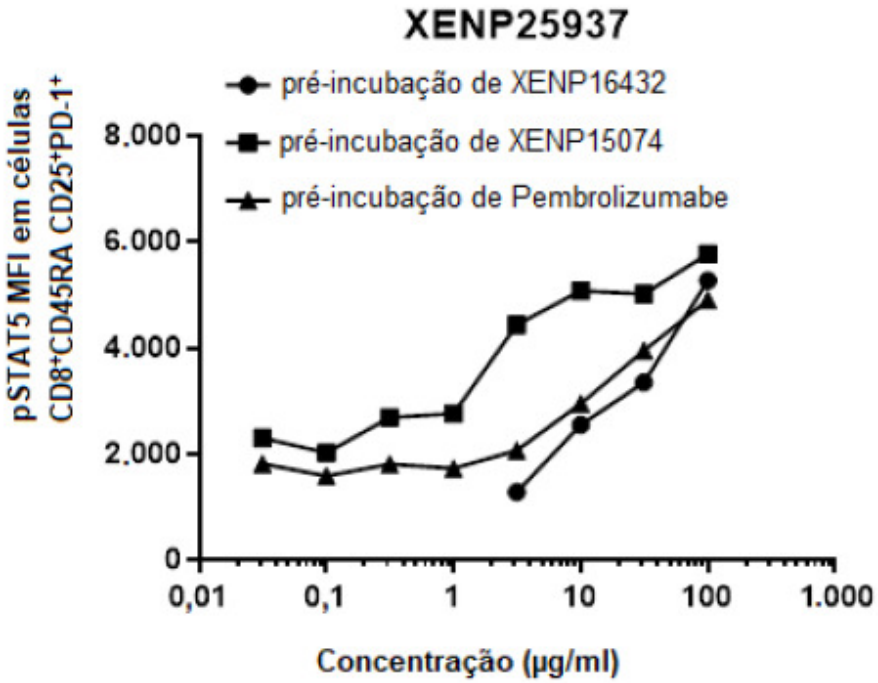


Figura 34B

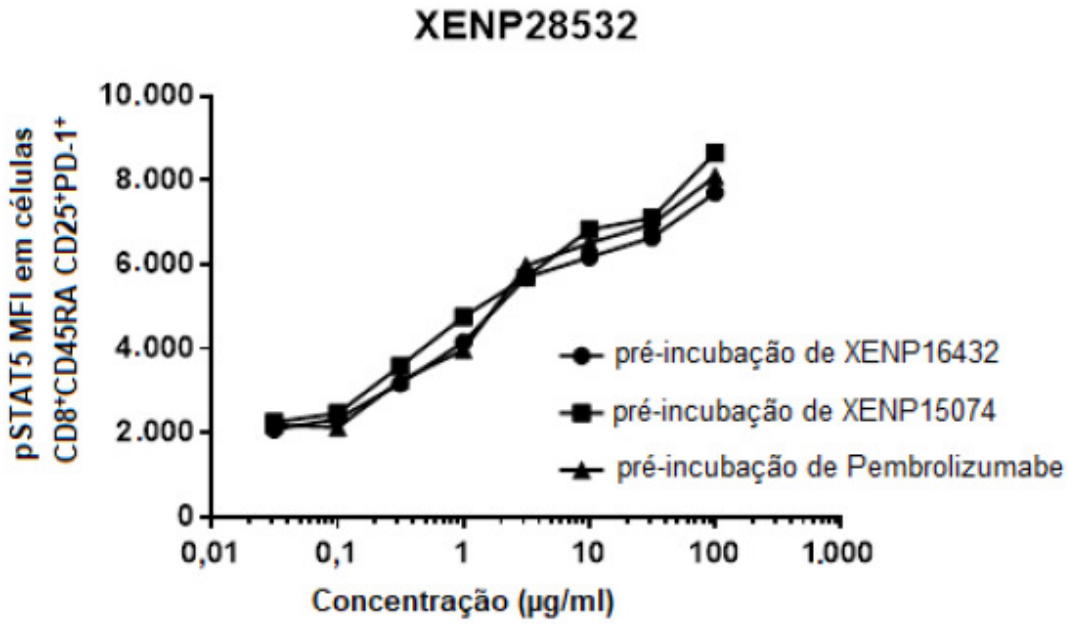


Figura 35

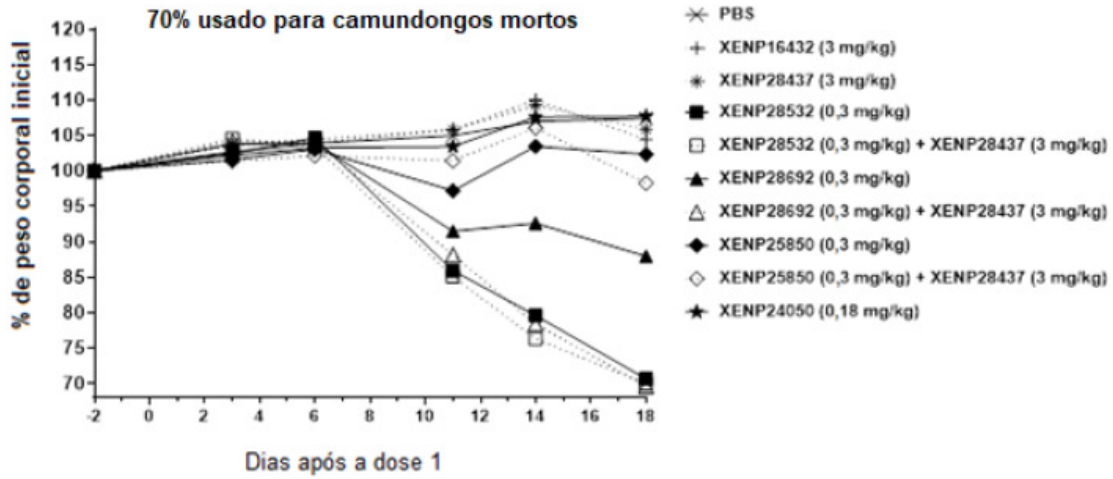

70% usado para camundongos mortos
% de peso corporal inicial
120
115
110
105
100
95
90
85
80
75
70
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Dias após a dose 1
PBS
XENP16432 (3 mg/kg)
XENP28437 (3 mg/kg)
XENP28532 (0,3 mg/kg)
XENP28532 (0,3 mg/kg) + XENP28437 (3 mg/kg)
XENP28692 (0,3 mg/kg)
XENP28692 (0,3 mg/kg) + XENP28437 (3 mg/kg)
XENP25850 (0,3 mg/kg)
XENP25850 (0,3 mg/kg) + XENP28437 (3 mg/kg)
XENP24050 (0,18 mg/kg)

Figura 36A

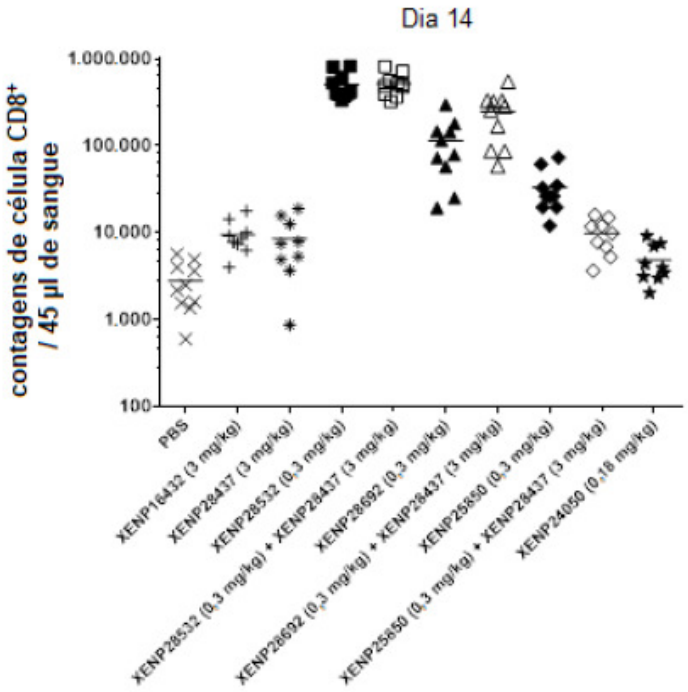


Figura 36B

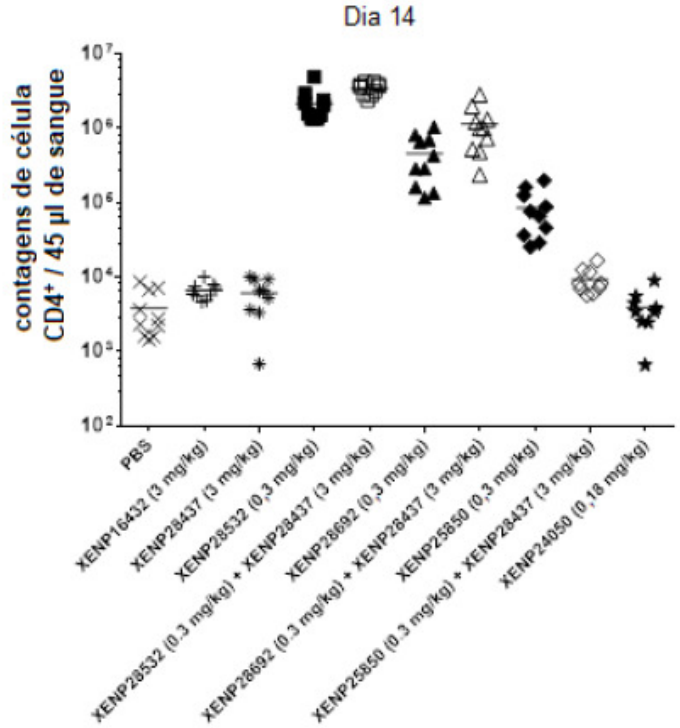


Figura 37A

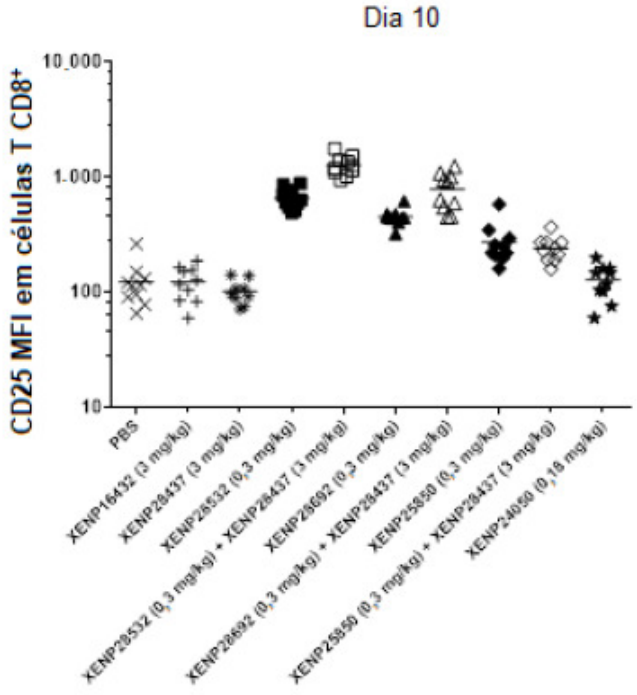


Figura 37B

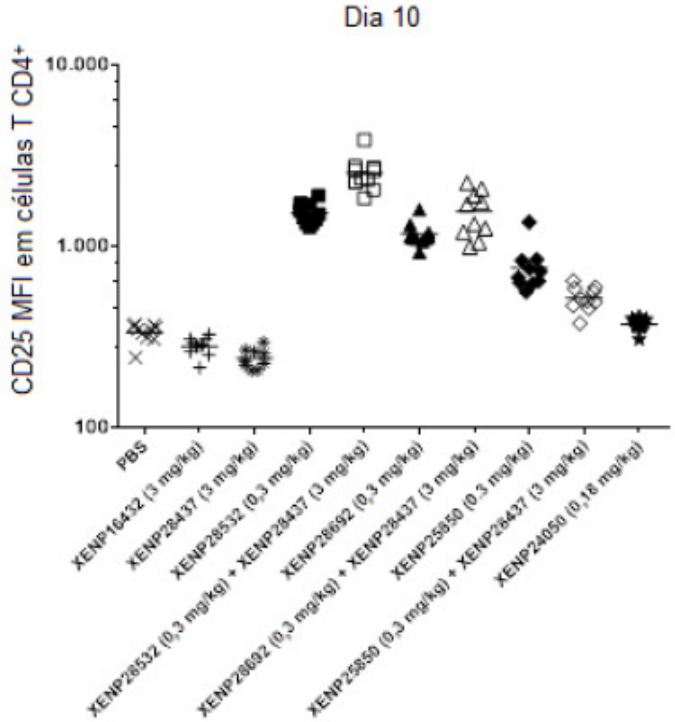


Figura 38

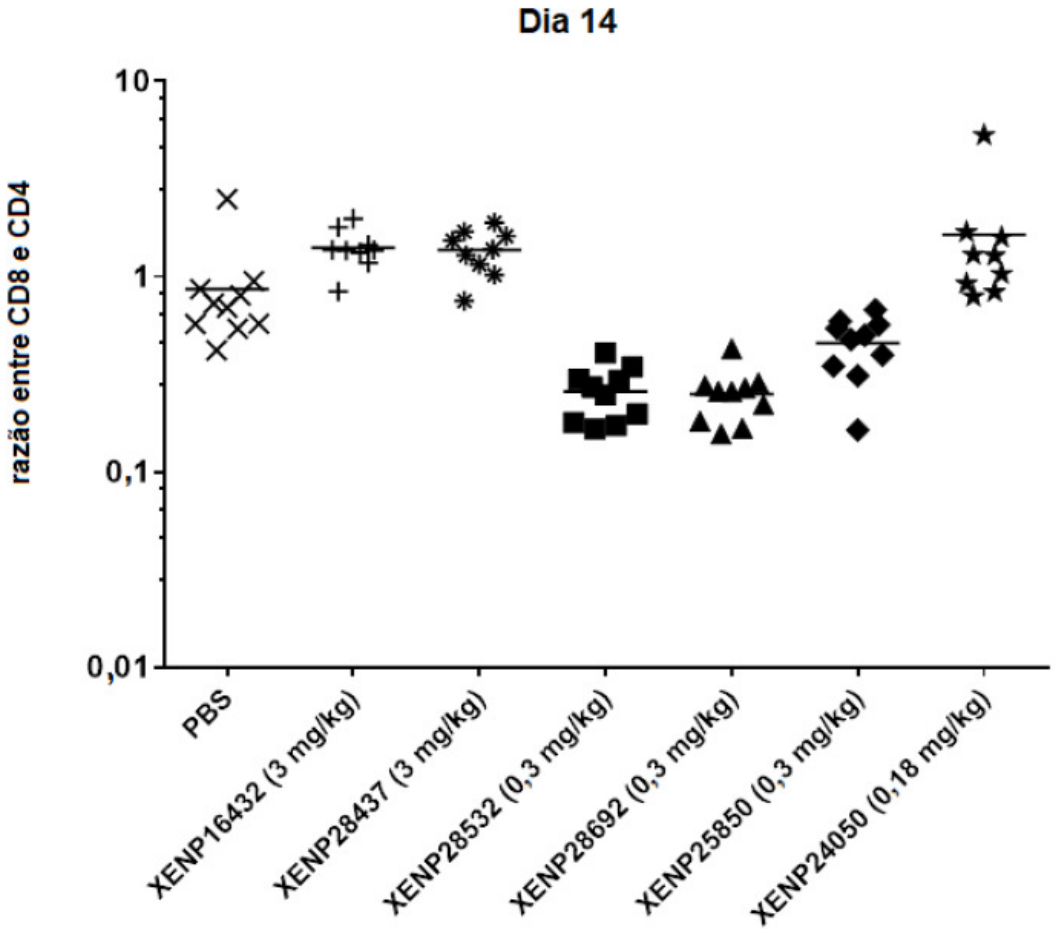

Dia 14
razão entre CD8 e CD4
10
1
0,1
0,01
PBS
XENP16432 (3 mg/kg)
XENP28437 (3 mg/kg)
XENP28532 (0,3 mg/kg)
XENP28692 (0,3 mg/kg)
XENP25850 (0,3 mg/kg)
XENP24050 (0,18 mg/kg)

Figura 39A

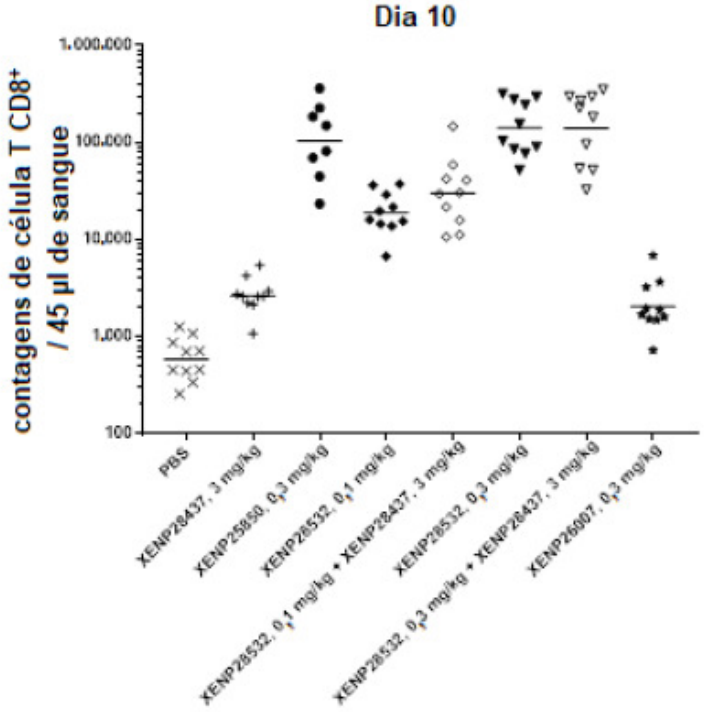


Figura 39B

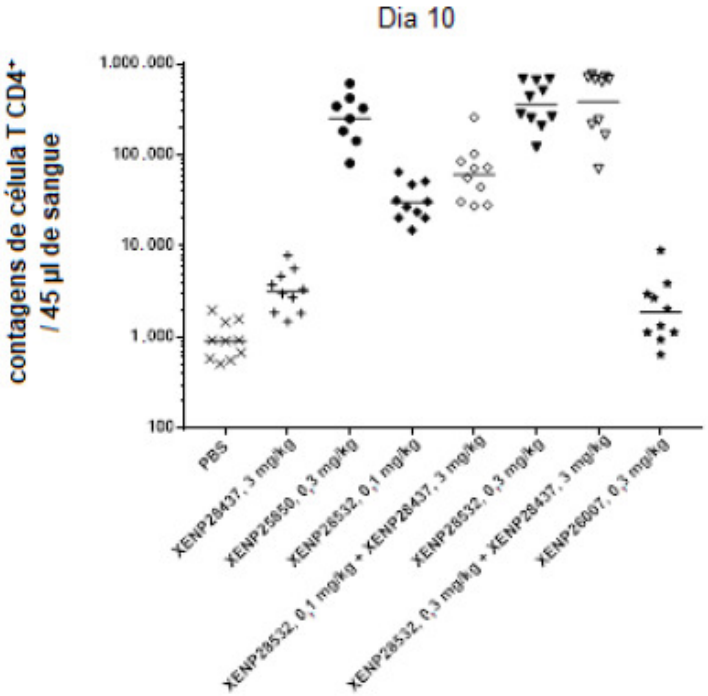


Figura 40A

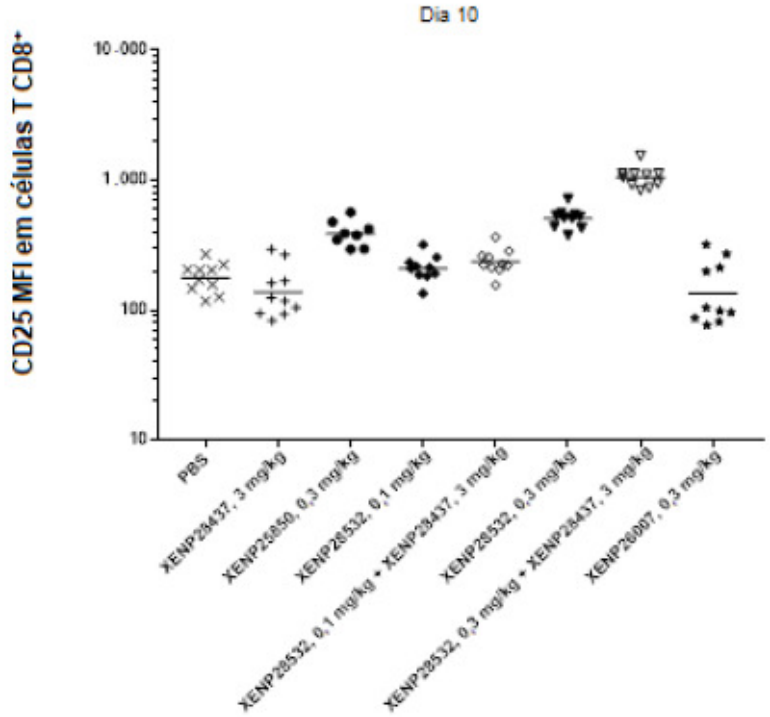


Figura 40B

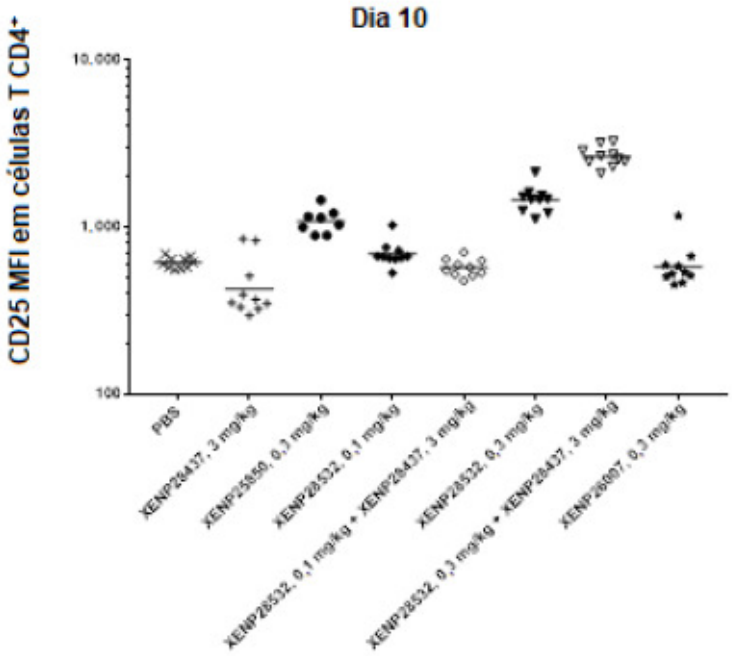


Figura 41

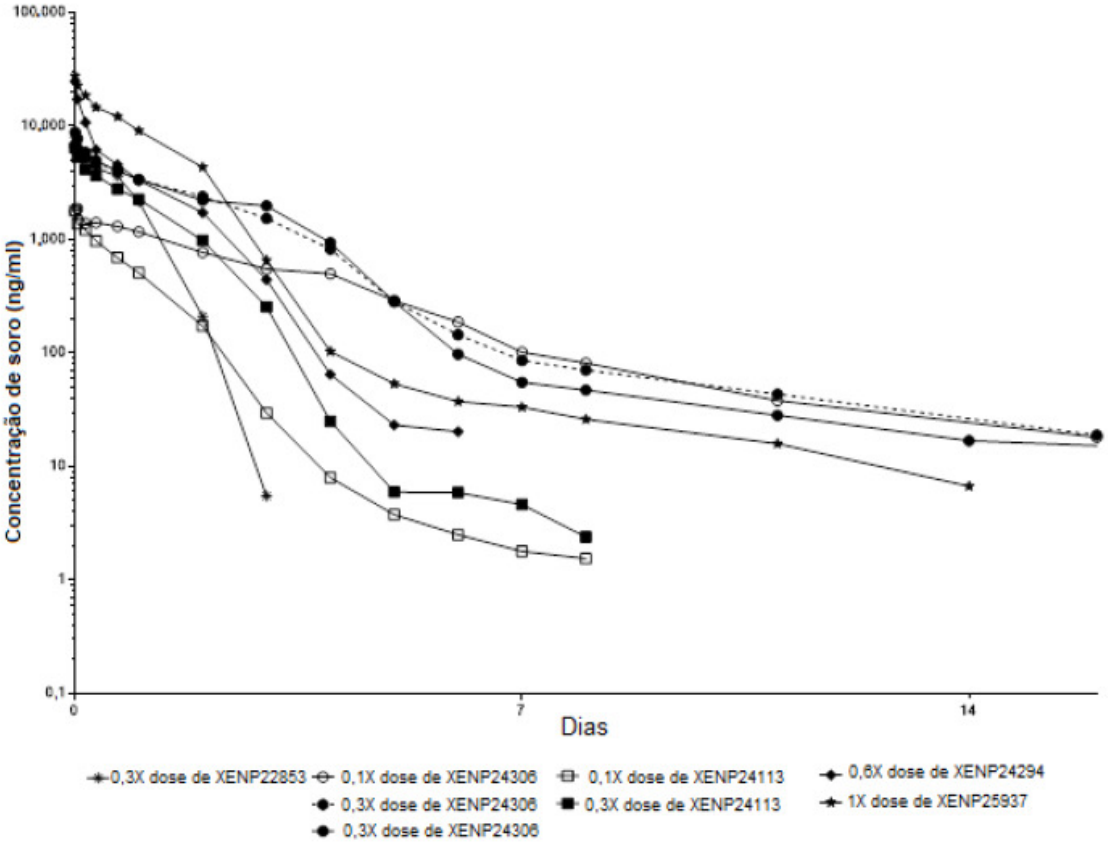

100,000
10,000
1,000
100
10
1
0,1
Concentração de soro (ng/ml)
0
7
14
Dias
0,3X dose de XENP22853
0,1X dose de XENP24306
0,1X dose de XENP24113
0,6X dose de XENP24294
0,3X dose de XENP24306
0,3X dose de XENP24113
1X dose de XENP25937
0,3X dose de XENP24306

Figura 42

>XENP29484 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-Chain)-mAb A[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia XENP29484 1 - Cadeia human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-Chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S scIL-15/Rα-Fc (SEQ ID NO: 190)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/*NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT VEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS*/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP29484 2 - Cadeia Pesada de mAb A[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 191)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSITSDYAWNWIRQPPGKKLEWIGYISYSGYTTYNPSLKSRVTISRDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYFCARDLDYGPWFAYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP29484 3 - Cadeia Leve de mAb A[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 192)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIHNYLAWYQQKPGKSPKLLVYNVKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYCQHFWSSPWTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP29485 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-Chain)-mAb B[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia XENP29485 1 - Cadeia human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-Chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S scIL-15/Rα-Fc (SEQ ID NO: 193)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/*NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT VEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS*/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP29485 2 - Cadeia Pesada de mAb B[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 194)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNFYIHWVRQAPGQSIEWMGSIYPNYGDTAYNQKFQGRVTMTVDKSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP29485 3 - Cadeia Leve de mAb B[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 195)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISGDLNWYQQKPGKTVKLLIYHTSSLHSGVPLRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYCQYYSKDLLTFGAGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 43A

mAb A[PD-1]_H1 (SEQ ID NO: 196)
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSITSDYAWNWIRQPPGKKLEWIGYISYSGYTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV
TAADTAVYFCARDLDYGPWFAYWGQGTLVTVSS

mAb A[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 197)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIHNYLAWYQQKPGKSPKLLVYNVKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQHFWSSPWTFGGGTKVEIK

mAb B[PD-1]_H1(SEQ ID NO: 198)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNFYIHWVRQAPGQSIEWMGSIYPNYGDTAYNQKFQGRVTMTVDKSISTAYMELSRL
RSDDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS

mAb B[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 199)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISGDLNWYQQKPGKTVKLLIYHTSSLHSGVPLRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQYYSKDLLTFGAGTKLEIK

mAb C[PD-1]_H1 (SEQ ID NO:5)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

mAb C[PD-1]_L1 (SEQ ID NO:6)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK

mAb C[PD1]_H1.1(SEQ ID NO: 200)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

mAb C[PD1]_H1.2 (SEQ ID NO: 201)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFASFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.3 (SEQ ID NO: 202)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFQSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.4 (SEQ ID NO: 203)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.5 (SEQ ID NO: 204)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.6 (SEQ ID NO: 205)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFHSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.7 (SEQ ID NO: 206)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.8 (SEQ ID NO: 207)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43B

>mAb C[PD1]_H1.9 (SEQ ID NO: 208)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.10 (SEQ ID NO: 209)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.11 (SEQ ID NO: 210)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.12 (SEQ ID NO: 211)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.13 (SEQ ID NO: 212)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.14 (SEQ ID NO: 213)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.15 (SEQ ID NO: 214)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.16 (SEQ ID NO: 215)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.17 (SEQ ID NO: 216)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.18 (SEQ ID NO: 217)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.19 (SEQ ID NO: 218)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.20 (SEQ ID NO: 219)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSWGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.21 (SEQ ID NO: 220)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSIGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.22 (SEQ ID NO: 221)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/

Figura 43C

>mAb C[PD1]_H1.23 (SEQ ID NO: 222)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.24 (SEQ ID NO: 223)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.25 (SEQ ID NO: 224)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSKGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.26 (SEQ ID NO: 225)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.27 (SEQ ID NO: 226)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.28 (SEQ ID NO: 227)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFTMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.29 (SEQ ID NO: 228)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFNMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/

>mAb C[PD1]_H1.30 (SEQ ID NO: 229)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFHMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/

>mAb C[PD1]_H1.31 (SEQ ID NO: 230)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFDMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.32 (SEQ ID NO: 231)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFKMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/

>mAb C[PD1]_H1.33 (SEQ ID NO: 232)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFLMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/

>mAb C[PD1]_H1.34 (SEQ ID NO: 233)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFYMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.35 (SEQ ID NO: 234)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMNWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.36 (SEQ ID NO: 235)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYITSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43D

>mAb C[PD1]_H1.37 (SEQ ID NO: 236)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYIASGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.38 (SEQ ID NO: 237)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYIQSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.39 (SEQ ID NO: 238)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYIGSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.40 (SEQ ID NO: 239)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYIVSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.41 (SEQ ID NO: 240)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYIHSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.42 (SEQ ID NO: 241)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYIKSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.43 (SEQ ID NO: 242)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYIYSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.44 (SEQ ID NO: 243)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYIESGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.45 (SEQ ID NO: 244)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISTGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.46 (SEQ ID NO: 245)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISAGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.47 (SEQ ID NO: 246)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISQGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.48 (SEQ ID NO: 247)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISGGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.49 (SEQ ID NO: 248)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISVGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.50 (SEQ ID NO: 249)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISHGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43E

>mAb C[PD1]_H1.51 (SEQ ID NO: 250)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISKGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.52 (SEQ ID NO: 251)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISYGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.53 (SEQ ID NO: 252)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISEGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.54 (SEQ ID NO: 253)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSASSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.55 (SEQ ID NO: 254)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.56 (SEQ ID NO: 255)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSTSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.57 (SEQ ID NO: 256)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSQSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.58 (SEQ ID NO: 257)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSHSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/

>mAb C[PD1]_H1.59 (SEQ ID NO: 258)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSKSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.60 (SEQ ID NO: 259)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSLSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.61 (SEQ ID NO: 260)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSYSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.62 (SEQ ID NO: 261)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGTSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.63 (SEQ ID NO: 262)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGASIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.64 (SEQ ID NO: 263)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGQSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43F

>mAb C[PD1]_H1.65 (SEQ ID NO: 264)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGGSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.66 (SEQ ID NO: 265)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGVSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.67 (SEQ ID NO: 266)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGHSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.68 (SEQ ID NO: 267)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGKSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.69 (SEQ ID NO: 268)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGYSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.70 (SEQ ID NO: 269)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGESIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.71 (SEQ ID NO: 270)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSTIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.72 (SEQ ID NO: 271)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSAIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.73 (SEQ ID NO: 272)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSQIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.74 (SEQ ID NO: 273)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSGIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.75 (SEQ ID NO: 274)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSVIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.76 (SEQ ID NO: 275)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSHIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.77 (SEQ ID NO: 276)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSDIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.78 (SEQ ID NO: 277)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSKIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43G

>mAb C[PD1]_H1.79 (SEQ ID NO: 278)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSYIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.80 (SEQ ID NO: 279)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSVIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.81 (SEQ ID NO: 280)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSLIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.82 (SEQ ID NO: 281)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSFIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.83 (SEQ ID NO: 282)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/

>mAb C[PD1]_H1.84 (SEQ ID NO: 283)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSWIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/

>mAb C[PD1]_H1.85 (SEQ ID NO: 284)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSAIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.86 (SEQ ID NO: 285)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSNIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.87 (SEQ ID NO: 286)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSEIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.88 (SEQ ID NO: 287)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSKIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.89 (SEQ ID NO: 288)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIVYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.90 (SEQ ID NO: 289)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSILYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.91 (SEQ ID NO: 290)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIFYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43H

>mAb C[PD1]_H1.92 (SEQ ID NO: 291)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSITYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.93 (SEQ ID NO: 292)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIWYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.94 (SEQ ID NO: 293)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIAYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.95 (SEQ ID NO: 294)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSINYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.96 (SEQ ID NO: 295)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIEYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.97 (SEQ ID NO: 296)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.98 (SEQ ID NO: 297)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIFYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.99 (SEQ ID NO: 298)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.100 (SEQ ID NO: 299)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIILYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.101 (SEQ ID NO: 300)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIWYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.102 (SEQ ID NO: 301)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIVYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.103 (SEQ ID NO: 302)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIAYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.104 (SEQ ID NO: 303)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIQYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.105 (SEQ ID NO: 304)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43I

>mAb C[PD1]_H1.106 (SEQ ID NO: 305)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIKYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.107 (SEQ ID NO: 306)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RAGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.108 (SEQ ID NO: 307)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RSGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.109 (SEQ ID NO: 308)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RTGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.110 (SEQ ID NO: 309)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RQGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.111 (SEQ ID NO: 310)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RHGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.112 (SEQ ID NO: 311)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RKGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.113 (SEQ ID NO: 312)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RLGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.114 (SEQ ID NO: 313)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RYGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.115 (SEQ ID NO: 314)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGARLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.116 (SEQ ID NO: 315)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGSRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.117 (SEQ ID NO: 316)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGTRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.118 (SEQ ID NO: 317)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGQRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.119 (SEQ ID NO: 318)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGHRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43J

>mAb C[PD1]_H1.120 (SEQ ID NO: 319)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGDRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.121 (SEQ ID NO: 320)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGKRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.122 (SEQ ID NO: 321)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGLRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.123 (SEQ ID NO: 322)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGYRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.124 (SEQ ID NO: 323)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGKLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.125 (SEQ ID NO: 324)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGELVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.126 (SEQ ID NO: 325)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGDLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.127 (SEQ ID NO: 326)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGHLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.128 (SEQ ID NO: 327)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGSLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.129 (SEQ ID NO: 328)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGGLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.130 (SEQ ID NO: 329)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGYLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.131 (SEQ ID NO: 330)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGILVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.132 (SEQ ID NO: 331)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGWLVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.133 (SEQ ID NO: 332)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRIVWSPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43K

>mAb C[PD1]_H1.134 (SEQ ID NO: 333)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRFVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.135 (SEQ ID NO: 334)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRVVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.136 (SEQ ID NO: 335)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRYVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.137 (SEQ ID NO: 336)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRWVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.138 (SEQ ID NO: 337)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRDVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.139 (SEQ ID NO: 338)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRAVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.140 (SEQ ID NO: 339)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRQVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.141 (SEQ ID NO: 340)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRKVWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.142 (SEQ ID NO: 341)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLTWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.143 (SEQ ID NO: 342)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLIWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.144 (SEQ ID NO: 343)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLLWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.145 (SEQ ID NO: 344)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLAWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.146 (SEQ ID NO: 345)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLYWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.147 (SEQ ID NO: 346)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLQWSPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43L

>mAb C[PD1]_H1.148 (SEQ ID NO: 347)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLWWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.149 (SEQ ID NO: 348)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLDWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.150 (SEQ ID NO: 349)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLKWSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.151 (SEQ ID NO: 350)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVFSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.152 (SEQ ID NO: 351)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVLSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.153 (SEQ ID NO: 352)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVYSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.154 (SEQ ID NO: 353)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVISPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.155 (SEQ ID NO: 354)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVHSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.156 (SEQ ID NO: 355)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVQSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.157 (SEQ ID NO: 356)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVSSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.158 (SEQ ID NO: 357)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVESPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.159 (SEQ ID NO: 358)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVRSPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.160 (SEQ ID NO: 359)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWTPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.161 (SEQ ID NO: 360)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWAPDYWGQGTLVTVSS

Figura 43M

>mAb C[PD1]_H1.162 (SEQ ID NO: 361)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWQPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.163 (SEQ ID NO: 362)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWGPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.164 (SEQ ID NO: 363)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWVPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.165 (SEQ ID NO: 364)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWHPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.166 (SEQ ID NO: 365)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWDPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.167 (SEQ ID NO: 366)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWKPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_H1.168 (SEQ ID NO: 367)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGGRLVWYPDYWGQGTLVTVSS

>mAb C[PD1]_L1.1 (SEQ ID NO: 368)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.2 (SEQ ID NO: 369)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLESGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.3 (SEQ ID NO: 370)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.4 (SEQ ID NO: 371)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLRSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.5 (SEQ ID NO: 372)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.6 (SEQ ID NO: 373)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLTSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.7 (SEQ ID NO: 374)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLGSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

Figura 43N

>mAb C[PD1]_L1.8 (SEQ ID NO: 375)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.9 (SEQ ID NO: 376)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNTGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.10 (SEQ ID NO: 377)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNAGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.11 (SEQ ID NO: 378)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNQGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.12 (SEQ ID NO: 379)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNVGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.13 (SEQ ID NO: 380)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNHGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.14 (SEQ ID NO: 381)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNKGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.15 (SEQ ID NO: 382)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNYGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.16 (SEQ ID NO: 383)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSANQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.17 (SEQ ID NO: 384)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSQNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.18 (SEQ ID NO: 385)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSHNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.19 (SEQ ID NO: 386)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSDNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.20 (SEQ ID NO: 387)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSKNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.21 (SEQ ID NO: 388)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSLNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

Figura 43O

>mAb C[PD1]_L1.22 (SEQ ID NO: 389)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSYNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.23 (SEQ ID NO: 390)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGDQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.24 (SEQ ID NO: 391)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGHQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.25 (SEQ ID NO: 392)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGEQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.26 (SEQ ID NO: 393)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGSQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.27 (SEQ ID NO: 394)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGRQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.28 (SEQ ID NO: 395)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGLQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.29 (SEQ ID NO: 396)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGTQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.30 (SEQ ID NO: 397)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGGQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.31 (SEQ ID NO: 398)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGYQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.32 (SEQ ID NO: 399)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNEKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.33 (SEQ ID NO: 400)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNHKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.34 (SEQ ID NO: 401)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNNKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.35 (SEQ ID NO: 402)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNKKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

Figura 43P

>mAb C[PD1]_L1.36 (SEQ ID NO: 403)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNAKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.37 (SEQ ID NO: 404)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNFKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.38 (SEQ ID NO: 405)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNIKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDY
SYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.39 (SEQ ID NO: 406)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.40 (SEQ ID NO: 407)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQENYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.41 (SEQ ID NO: 408)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQHNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.42 (SEQ ID NO: 409)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQDNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.43 (SEQ ID NO: 410)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQANYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.44 (SEQ ID NO: 411)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQGNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.45 (SEQ ID NO: 412)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.46 (SEQ ID NO: 413)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQINYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.47 (SEQ ID NO: 414)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKDYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.48 (SEQ ID NO: 415)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKHYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.49 (SEQ ID NO: 416)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKEYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

Figura 43Q

>mAb C[PD1]_L1.50 (SEQ ID NO: 417)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKSYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.51 (SEQ ID NO: 418)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKRYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.52 (SEQ ID NO: 419)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKLYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.53 (SEQ ID NO: 420)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKTYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.54 (SEQ ID NO: 421)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKGYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.55 (SEQ ID NO: 422)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKYYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.56 (SEQ ID NO: 423)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNFLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.57 (SEQ ID NO: 424)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNHLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.58 (SEQ ID NO: 425)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNLLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.59 (SEQ ID NO: 426)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNWLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.60 (SEQ ID NO: 427)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNVLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.61 (SEQ ID NO: 428)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNALTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.62 (SEQ ID NO: 429)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNQLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.63 (SEQ ID NO: 430)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNDLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

Figura 43R

>mAb C[PD1]_L1.64 (SEQ ID NO: 431)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNKLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.65 (SEQ ID NO: 432)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.66 (SEQ ID NO: 433)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDY
SYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.67 (SEQ ID NO: 434)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYLASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDY
SYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.68 (SEQ ID NO: 435)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYYASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.69 (SEQ ID NO: 436)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYIASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDY
SYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.70 (SEQ ID NO: 437)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYHASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.71 (SEQ ID NO: 438)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYQASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.72 (SEQ ID NO: 439)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYSASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDY
SYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.73 (SEQ ID NO: 440)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYDASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.74 (SEQ ID NO: 441)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.75 (SEQ ID NO: 442)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASVRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.76 (SEQ ID NO: 443)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASSRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.77 (SEQ ID NO: 444)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASARESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

Figura 43S

>mAb C[PD1]_L1.78 (SEQ ID NO: 445)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.79 (SEQ ID NO: 446)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASQRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.80 (SEQ ID NO: 447)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASHRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.81 (SEQ ID NO: 448)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASDRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.82 (SEQ ID NO: 449)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASKRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.83 (SEQ ID NO: 450)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASYRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.84 (SEQ ID NO: 451)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.85 (SEQ ID NO: 452)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRKSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.86 (SEQ ID NO: 453)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRSSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.87 (SEQ ID NO: 454)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRHSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.88 (SEQ ID NO: 455)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRASGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.89 (SEQ ID NO: 456)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRGSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.90 (SEQ ID NO: 457)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRFSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.91 (SEQ ID NO: 458)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRISGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

Figura 43T

>mAb C[PD1]_L1.92 (SEQ ID NO: 459)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRETGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.93 (SEQ ID NO: 460)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTREAGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.94 (SEQ ID NO: 461)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTREQGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.95 (SEQ ID NO: 462)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTREVGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.96 (SEQ ID NO: 463)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTREHGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN
DYSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.97 (SEQ ID NO: 464)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTREKGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.98 (SEQ ID NO: 465)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTREYGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.99 (SEQ ID NO: 466)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.100 (SEQ ID NO: 467)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNQ
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.101 (SEQ ID NO: 468)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNE
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.102 (SEQ ID NO: 469)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNH
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.103 (SEQ ID NO: 470)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNS
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.104 (SEQ ID NO: 471)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNR
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.105 (SEQ ID NO: 472)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNL
YSYPFTFGSGTKLEIK

Figura 43U

>mAb C[PD1]_L1.106 (SEQ ID NO: 473)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNT
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.107 (SEQ ID NO: 474)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNG
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.108 (SEQ ID NO: 475)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNY
YSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.109 (SEQ ID NO: 476)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
FSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.110 (SEQ ID NO: 477)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
HSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.111 (SEQ ID NO: 478)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
LSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.112 (SEQ ID NO: 479)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
WSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.113 (SEQ ID NO: 480)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
VSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.114 (SEQ ID NO: 481)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
ASYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.115 (SEQ ID NO: 482)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
QSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.116 (SEQ ID NO: 483)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
KSYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.117 (SEQ ID NO: 484)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YTYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.118 (SEQ ID NO: 485)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YAYPFTFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.119 (SEQ ID NO: 486)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND
YQYPFTFGSGTKLEIK

Figura 43V

>mAb C[PD1]_L1.120 (SEQ ID NO: 487)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYGYPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.121 (SEQ ID NO: 488)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYVYPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.122 (SEQ ID NO: 489)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYHYPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.123 (SEQ ID NO: 490)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYDYPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.124 (SEQ ID NO: 491)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYKYPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.125 (SEQ ID NO: 492)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYFYPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.126 (SEQ ID NO: 493)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSFPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.127 (SEQ ID NO: 494)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSHPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.128 (SEQ ID NO: 495)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSLPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.129 (SEQ ID NO: 496)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSWPF
TFGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.130 (SEQ ID NO: 497)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSVPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.131 (SEQ ID NO: 498)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSAPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.132 (SEQ ID NO: 499)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSQPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.133 (SEQ ID NO: 500)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSDPFT
FGSGTKLEIK

>mAb C[PD1]_L1.134 (SEQ ID NO: 501)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSKPFT
FGSGTKLEIK

Figura 43W

Pesada Variável de mAb C[PD-1]_H1 (SEQ ID NO: 502)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Pesada Variável de mAb C[PD-1]_H1.19 (SEQ ID NO: 503)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Pesada Variável de mAb C[PD-1]_H1.48 (SEQ ID NO: 504)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISGGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Pesada Variável de mAb C[PD-1]_H1.125 (SEQ ID NO: 505)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGELVWSPDYWGQGTLVTVSS

Pesada Variável de mAb C[PD-1]_H1.130 (SEQ ID NO: 506)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGYLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Pesada Variável de mAb C[PD-1]_H1.132 (SEQ ID NO: 507)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGWLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Pesada Variável de mAb C[PD-1]_H1.169 (SEQ ID NO: 508)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLGMHWVRQAPGKGLEWVSYISGGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Pesada Variável de mAb C[PD-1]_H1.175 (SEQ ID NO: 509)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLGMHWVRQAPGKGLEWVSYISGGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGWLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Pesada Variável de mAb C[PD-1]_H2 (SEQ ID NO: 510)
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVGYISSGSSIIYYADPVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
KTEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS

Pesada Variável de mAb C[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 511)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK

Leve Variável de mAb C[PD-1]_L1.1 (SEQ ID NO: 512)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK

Leve Variável de mAb C[PD-1]_L1.3 (SEQ ID NO: 513)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK

Leve Variável de mAb C[PD-1]_L1.45 (SEQ ID NO: 514)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK

Figura 43X

Leve Variável de mAb C[PD-1]_L1.117 (SEQ ID NO: 515)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYTYPFTFGSGTKLEIK

Leve Variável de mAb C[PD-1]_L1.129 (SEQ ID NO: 516)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSWPFTFGSGTKLEIK

Leve Variável de mAb C[PD-1]_L1.135 (SEQ ID NO: 517)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK

Leve Variável de mAb C[PD-1]_L1.136 (SEQ ID NO: 518)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYTYPFTFGSGTKLEIK

Leve Variável de mAb C[PD-1]_L1.140 (SEQ ID NO: 519)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYTYPFTFGSGTKLEIK

Leve Variável de mAb C[PD-1]_L2 (SEQ ID NO: 520)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPQLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEA
EDVGVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK

Figura 44A

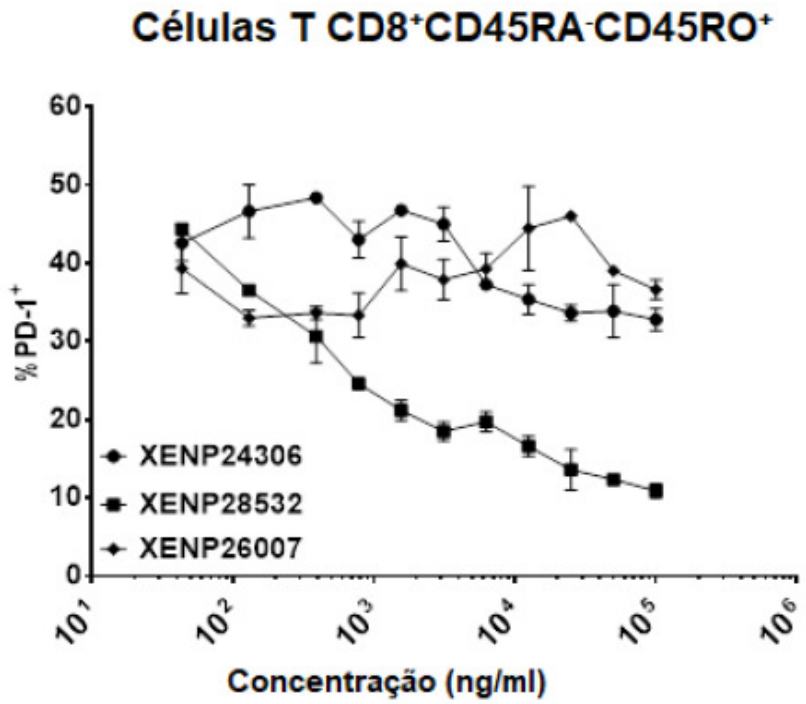


Figura 44B

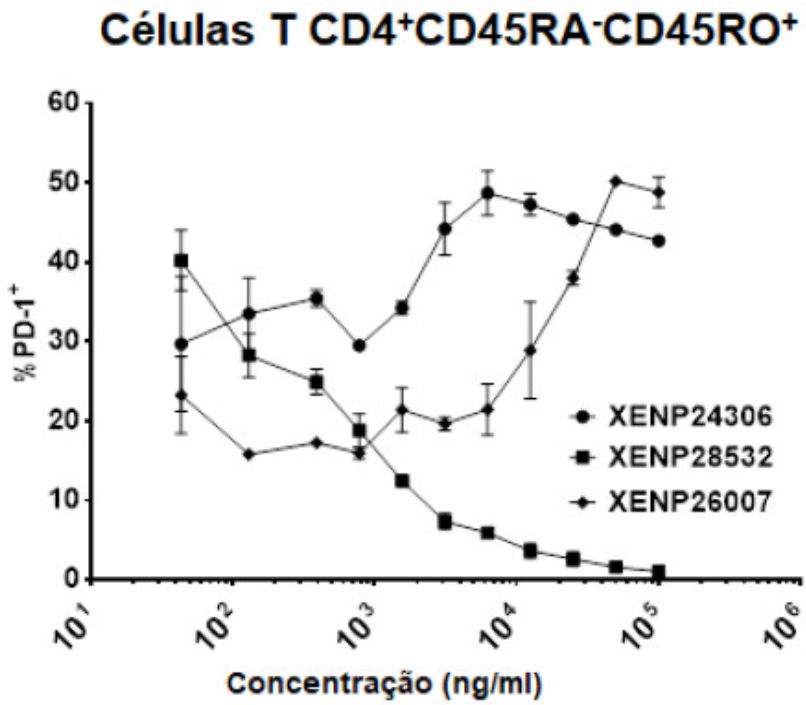


Figura 45

>XENP28536 mAb C[PD-1]_H1L1_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia XENP28536 1 - Cadeia Pesada de mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 521)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP28536 2 - Cadeia Leve de mAb C[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 522)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP28537 mAb C[PD-1]_H1L2_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia XENP28537 1 - Cadeia Pesada de mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 523)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP28537 2 - Cadeia Leve de mAb C[PD-1]_L2 (SEQ ID NO: 524)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPQLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEA
EDVGVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP28538 mAb C[PD-1]_H2L1_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia XENP28538 1 - Cadeia Pesada de mAb C[PD-1]_H2_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 525)
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVGYISSGSSIIYYADPVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
KTEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP28538 2 - Cadeia Leve de mAb C[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 526)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP28539 mAb C[PD-1]_H2L2_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia XENP28539 1 - Cadeia Pesada de mAb C[PD-1]_H2_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 527)
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVGYISSGSSIIYYADPVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
KTEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia XENP28539 2 - Cadeia Leve de mAb C[PD-1]_L2 (SEQ ID NO: 528)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPQLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEA
EDVGVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 46

	K_D para PD-1 Humano	K_D para PD-1 Cino
XENP28536	2,40E-08 M	3,58E-08 M
XENP28537	3,04E-08 M	4,2E-08 M
XENP28538	SEM LIGAÇÃO	SEM LIGAÇÃO
XENP28539	SEM LIGAÇÃO	SEM LIGAÇÃO
XENP28519	1,19E-08 M	SEM LIGAÇÃO

Figura 47

	XENP16432	XENP21461	chmAb C	PDL1-Fc
XENP16432	0,0468	0,0143	0,9248	0,1582
XENP21461	0,0816	0,0301	0,8414	0,1585
chmAb C	0,8851	0,9078	0,0237	0,3376
HBS-EP	1	1	1	1
PDL1-Fc	0,5418	0,5045	0,9341	0,3162

Figura 48A

>XENP28543 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 529)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 530)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 531)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP29483 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 532)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 533)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 534)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 48B

>XENP30428 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 535)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 536)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 537)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30429 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 538)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 539)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.1 (SEQ ID NO: 540)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 48C

>XENP30430 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.3_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 541)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANN
SLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQ
GDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 542)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.3 (SEQ ID NO: 543)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS
SLQAEDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 49A

>XENP29439 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 544)
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 545)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL
HEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 546)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30302 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 547)
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 548)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL
HEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 549)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 49B

>XENP30519 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1L1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 550)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 551)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL
HEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1 (SEQ ID NO: 552)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30516 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 553)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 554)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL
HEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.1 (SEQ ID NO: 555)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 49C

>XENP30517 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.3_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/E64Q/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 556)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 557)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL
HEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.3 (SEQ ID NO: 558)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 50

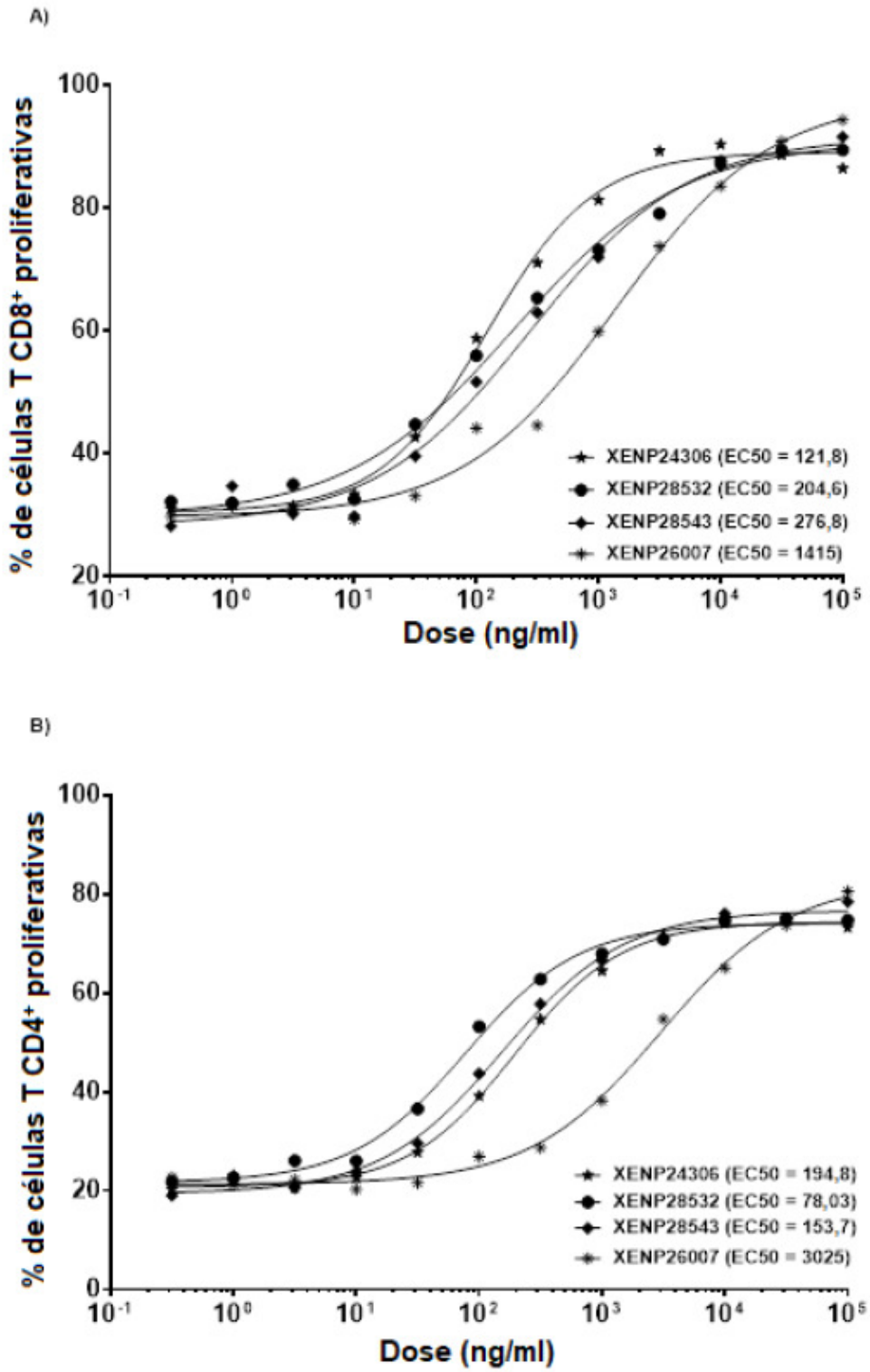

A)
% de células T CD8+ proliferativas
100
80
60
40
20
10-1
100
101
102
103
104
105
Dose (ng/ml)
XENP24306 (EC50 = 121,8)
XENP28532 (EC50 = 204,6)
XENP28543 (EC50 = 276,8)
XENP26007 (EC50 = 1415)
B)
% de células T CD4+ proliferativas
100
80
60
40
20
0
10-1
100
101
102
103
104
105
Dose (ng/ml)
XENP24306 (EC50 = 194,8)
XENP28532 (EC50 = 78,03)
XENP28543 (EC50 = 153,7)
XENP26007 (EC50 = 3025)

Figura 51

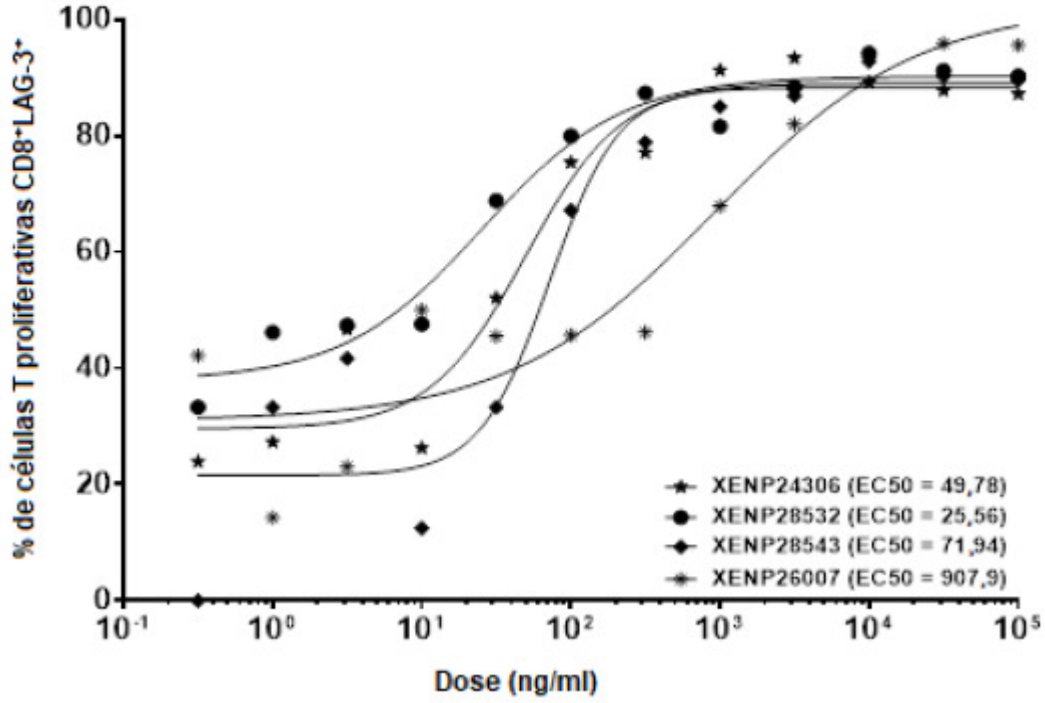

% de células T proliferativas CD8+LAG-3+
100
80
60
40
20
0
10-1
100
101
102
103
104
105
Dose (ng/ml)
XENP24306 (EC50 = 49,78)
XENP28532 (EC50 = 25,56)
XENP28543 (EC50 = 71,94)
XENP26007 (EC50 = 907,9)

Figura 52

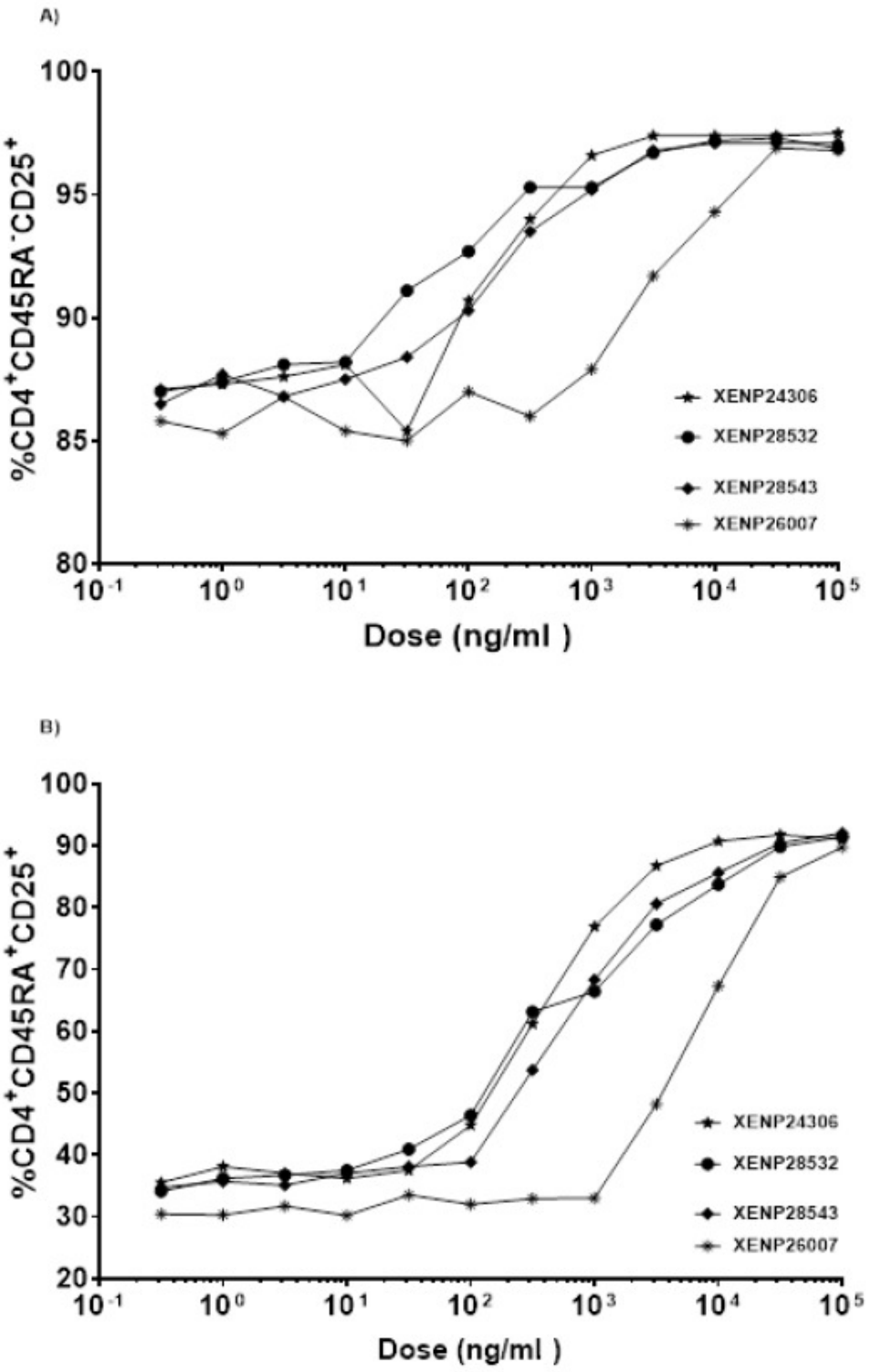

A)
%CD4+CD45RA-CD25+
100
95
90
85
80
10-1
100
101
102
103
104
105
Dose (ng/ml)
XENP24306
XENP28532
XENP28543
XENP26007
B)
%CD4+CD45RA+CD25+
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10-1
100
101
102
103
104
105
Dose (ng/ml)
XENP24306
XENP28532
XENP28543
XENP26007

Figura 53

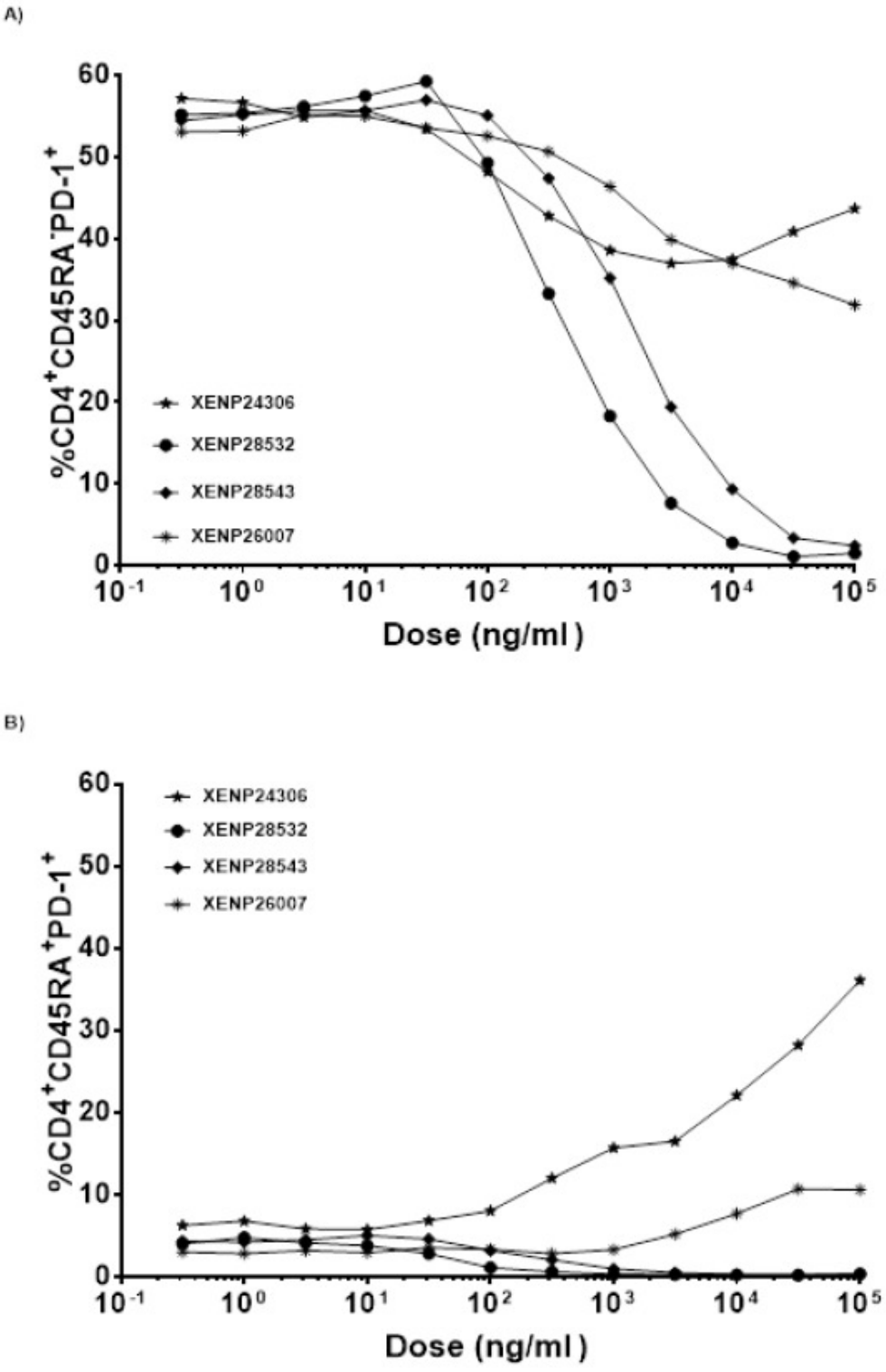

A)
%CD4+CD45RA-PD-1+
60
50
40
30
20
10
0
XENP24306
XENP28532
XENP28543
XENP26007
10-1
100
101
102
103
104
105
Dose (ng/ml)
B)
%CD4+CD45RA+PD-1+
60
50
40
30
20
10
0
XENP24306
XENP28532
XENP28543
XENP26007
10-1
100
101
102
103
104
105
Dose (ng/ml)

Figura 54

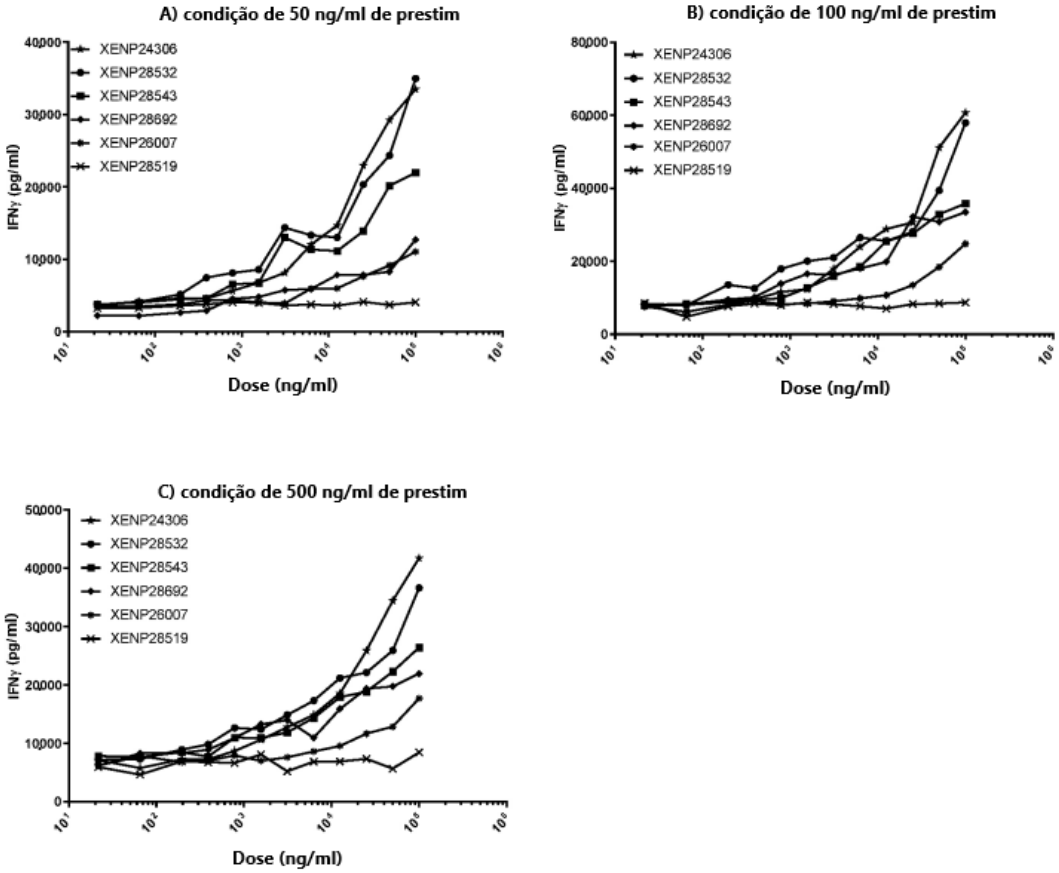

A) condição de 50 ng/ml de prestim
B) condição de 100 ng/ml de prestim
C) condição de 500 ng/ml de prestim
XENP24306
XENP28532
XENP28543
XENP28692
XENP26007
XENP28519
IFNγ (pg/ml)
Dose (ng/ml)

Figura 55

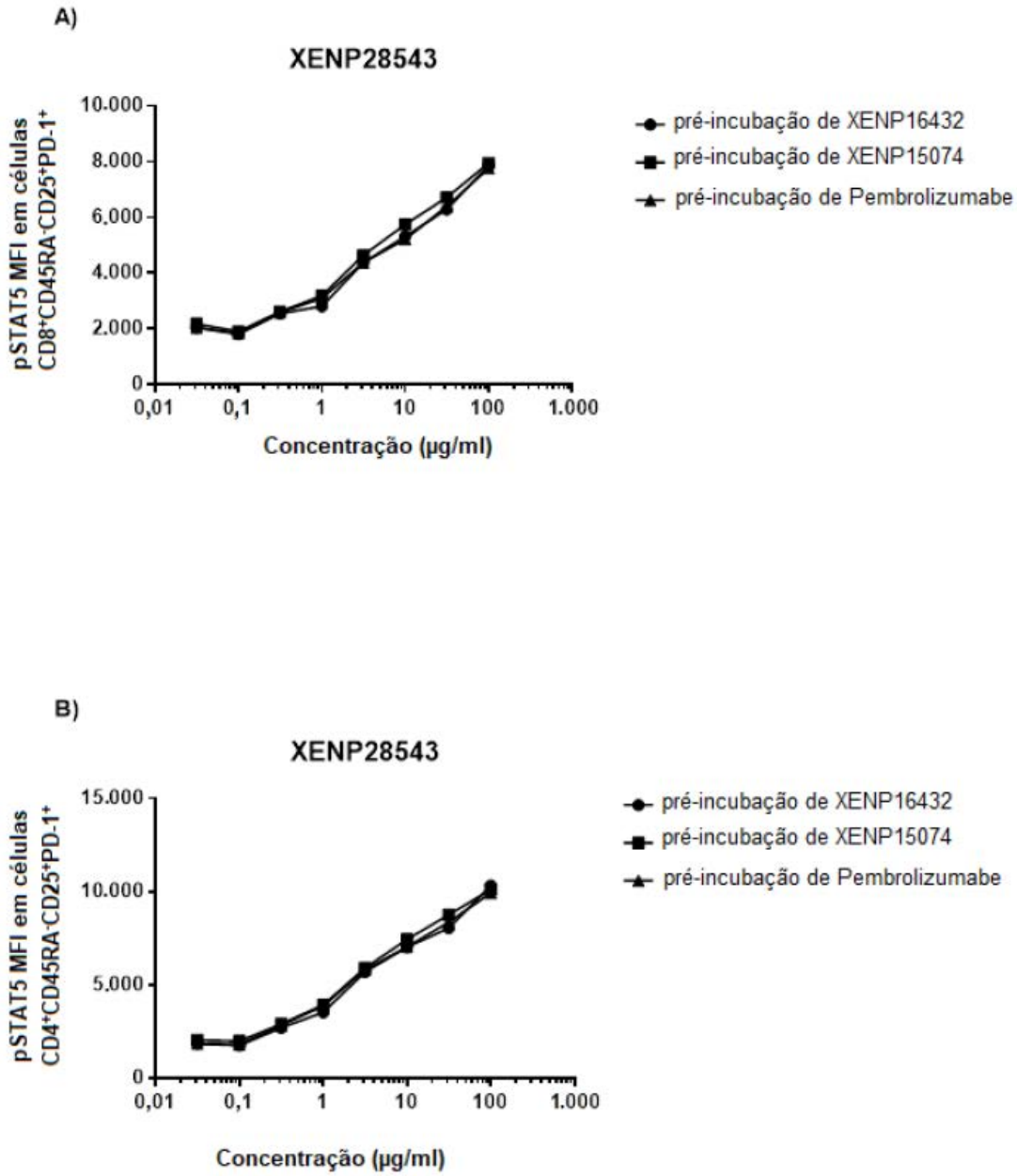

A)
XENP28543
pSTAT5 MFI em células CD8+CD45RA-CD25+PD-1+
10.000
8.000
6.000
4.000
2.000
0
0,01
0,1
1
10
100
1.000
Concentração (µg/ml)
pré-incubação de XENP16432
pré-incubação de XENP15074
pré-incubação de Pembrolizumabe
B)
XENP28543
pSTAT5 MFI em células CD4+CD45RA-CD25+PD-1+
15.000
10.000
5.000
0
0,01
0,1
1
10
100
1.000
Concentração (µg/ml)
pré-incubação de XENP16432
pré-incubação de XENP15074
pré-incubação de Pembrolizumabe

Figura 56

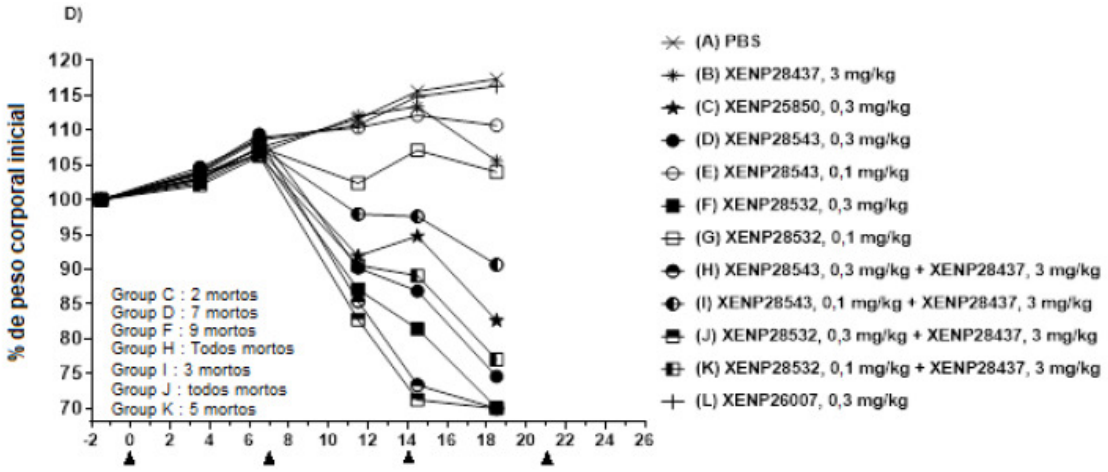

D)
% de peso corporal inicial
120
115
110
105
100
95
90
85
80
75
70
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
Group C : 2 mortos
Group D : 7 mortos
Group F : 9 mortos
Group H : Todos mortos
Group I : 3 mortos
Group J : todos mortos
Group K : 5 mortos
(A) PBS
(B) XENP28437, 3 mg/kg
(C) XENP25850, 0,3 mg/kg
(D) XENP28543, 0,3 mg/kg
(E) XENP28543, 0,1 mg/kg
(F) XENP28532, 0,3 mg/kg
(G) XENP28532, 0,1 mg/kg
(H) XENP28543, 0,3 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(I) XENP28543, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(J) XENP28532, 0,3 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(K) XENP28532, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(L) XENP26007, 0,3 mg/kg

Figura 57

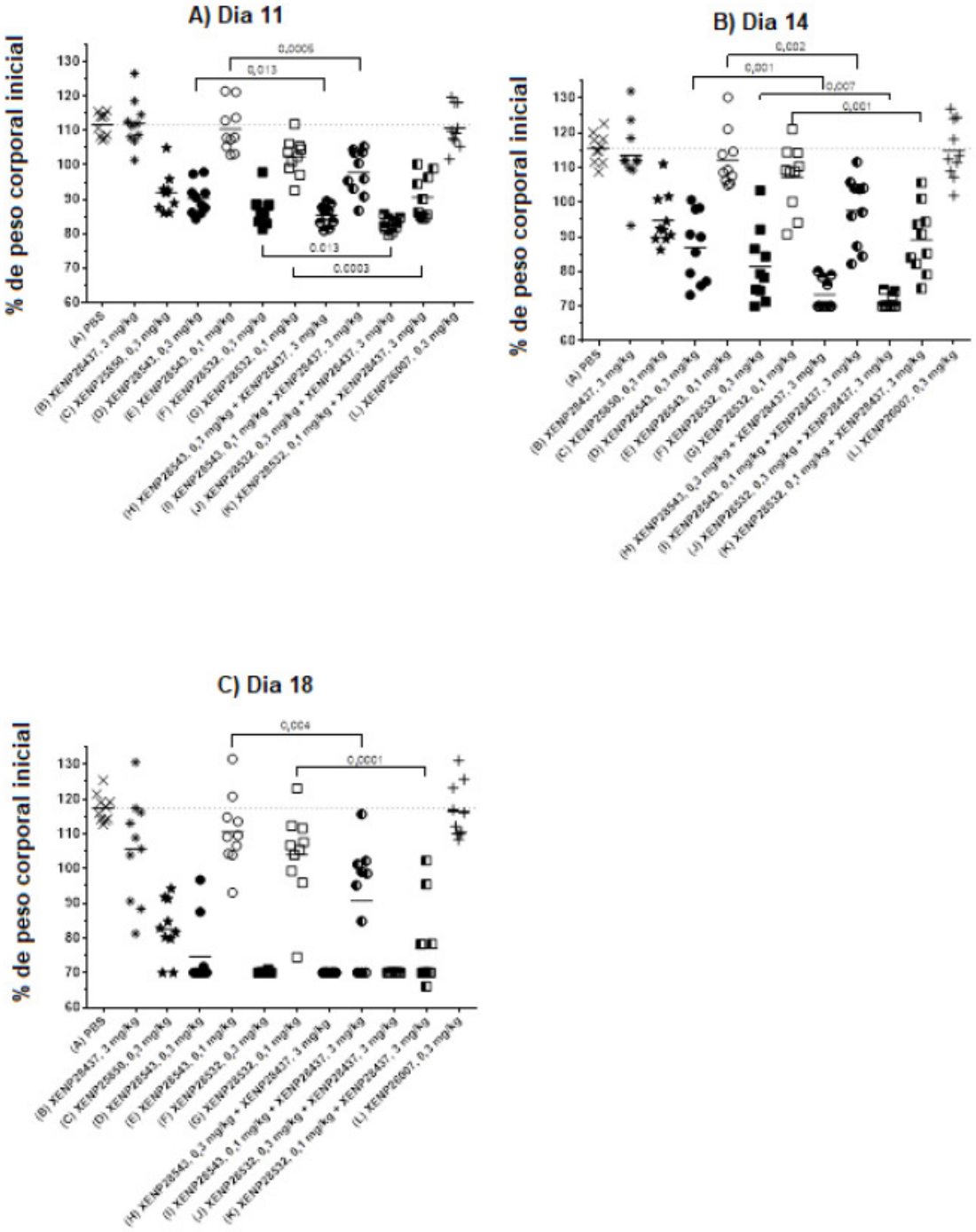

A) Dia 11
% de peso corporal inicial
0,0005
0,013
0,013
0,0003
B) Dia 14
% de peso corporal inicial
0,002
0,001
0,007
0,001
C) Dia 18
% de peso corporal inicial
0,004
0,0001
(A) PBS
(B) XENP28437, 3 mg/kg
(C) XENP25650, 0,3 mg/kg
(D) XENP26543, 0,3 mg/kg
(E) XENP26543, 0,1 mg/kg
(F) XENP26532, 0,3 mg/kg
(G) XENP26532, 0,1 mg/kg
(H) XENP26543, 0,3 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(I) XENP26543, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(J) XENP26532, 0,3 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(K) XENP26532, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(L) XENP26607, 0,3 mg/kg

Figura 58

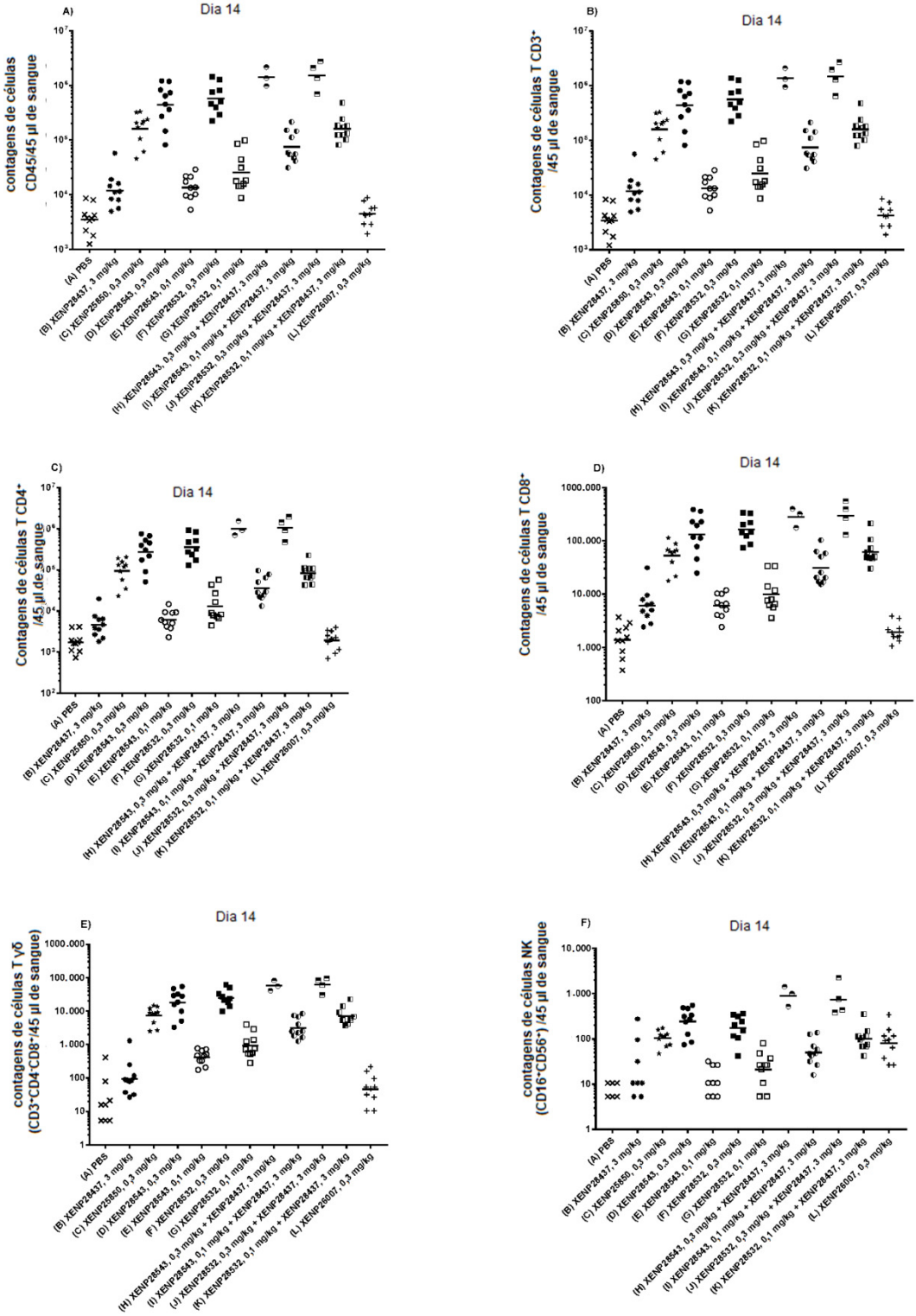

A)
Dia 14
contagens de células CD45/45 µl de sangue
B)
Dia 14
Contagens de células T CD3+ /45 µl de sangue
C)
Dia 14
Contagens de células T CD4+ /45 µl de sangue
D)
Dia 14
Contagens de células T CD8+ /45 µl de sangue
E)
Dia 14
contagens de células T γδ (CD3+CD4-CD8-/45 µl de sangue)
F)
Dia 14
contagens de células NK (CD16+CD56+) /45 µl de sangue
(A) PBS
(B) XENP28437, 3 mg/kg
(C) XENP25850, 0,3 mg/kg
(D) XENP28543, 0,3 mg/kg
(E) XENP28543, 0,1 mg/kg
(F) XENP28532, 0,3 mg/kg
(G) XENP28532, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(H) XENP28543, 0,3 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(I) XENP28543, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(J) XENP28532, 0,3 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(K) XENP28532, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(L) XENP26007, 0,3 mg/kg

Figura 59

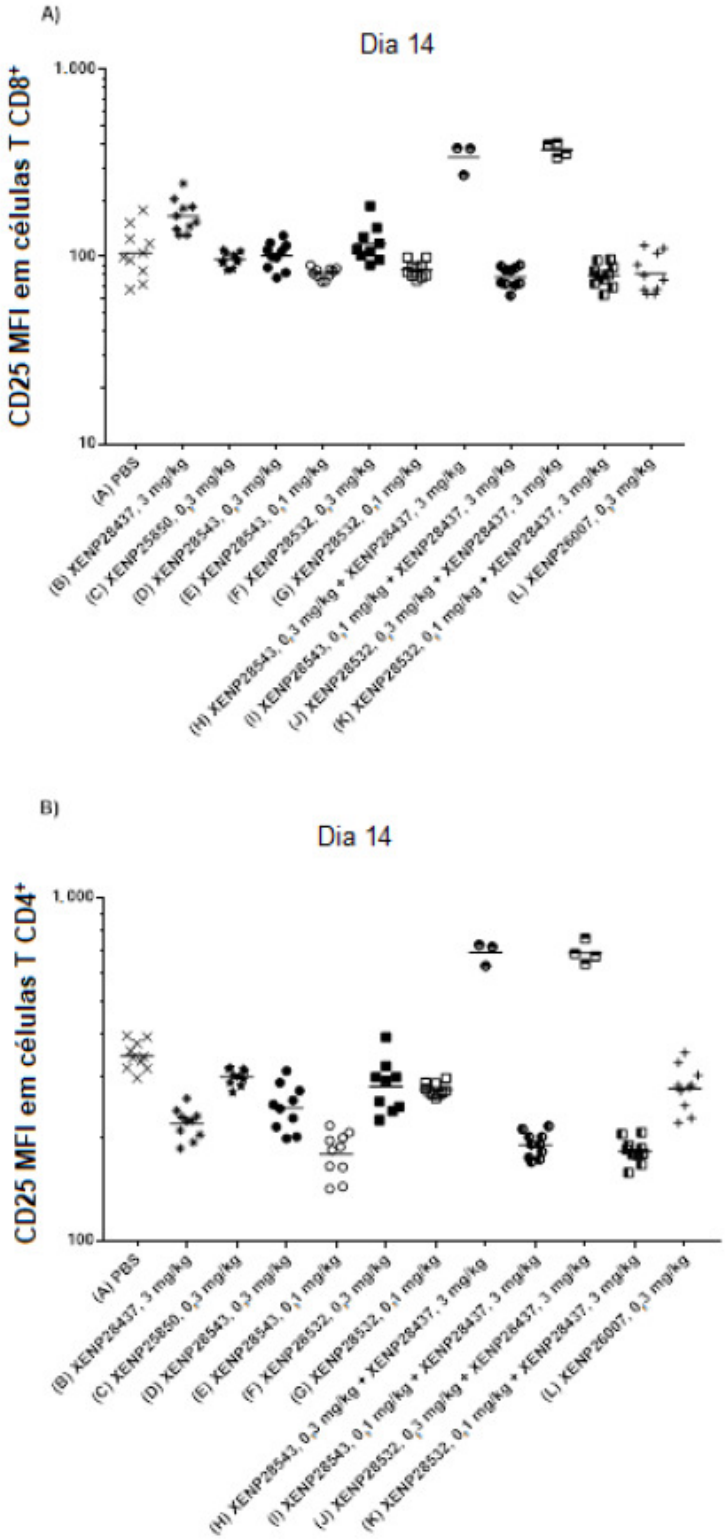

A)
Dia 14
CD25 MFI em células T CD8+
1.000
100
10
(A) PBS
(B) XENP28437, 3 mg/kg
(C) XENP25850, 0,3 mg/kg
(D) XENP28543, 0,3 mg/kg
(E) XENP28543, 0,1 mg/kg
(F) XENP28532, 0,3 mg/kg
(G) XENP28532, 0,1 mg/kg
(H) XENP28543, 0,3 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(I) XENP28543, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(J) XENP28532, 0,3 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(K) XENP28532, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(L) XENP26007, 0,3 mg/kg
B)
Dia 14
CD25 MFI em células T CD4+
1.000
100
(A) PBS
(B) XENP28437, 3 mg/kg
(C) XENP25850, 0,3 mg/kg
(D) XENP28543, 0,3 mg/kg
(E) XENP28543, 0,1 mg/kg
(F) XENP28532, 0,3 mg/kg
(G) XENP28532, 0,1 mg/kg
(H) XENP28543, 0,3 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(I) XENP28543, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(J) XENP28532, 0,3 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(K) XENP28532, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
(L) XENP26007, 0,3 mg/kg

Figura 60

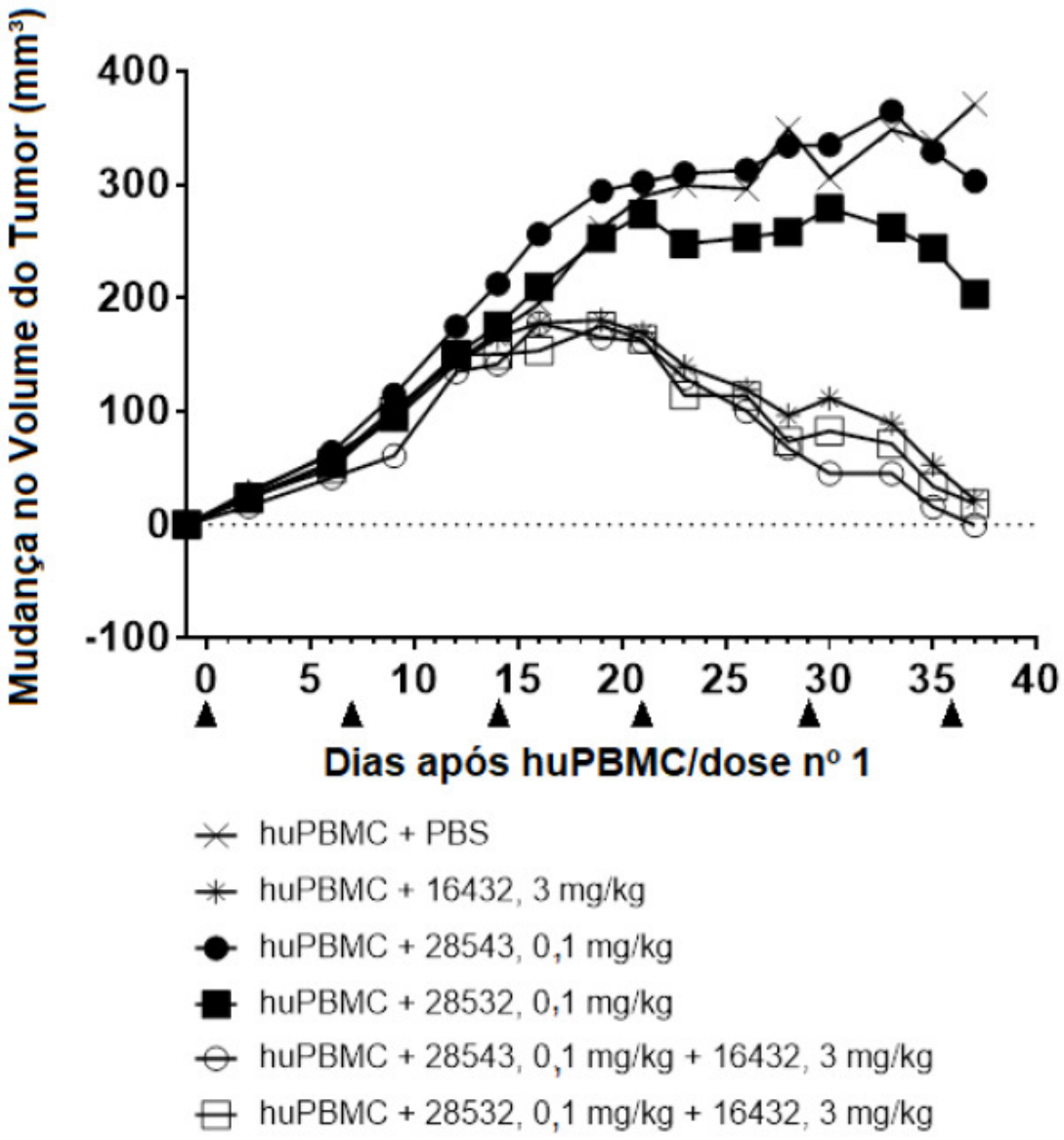

Mudança no Volume do Tumor (mm³)
400
300
200
100
0
-100
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Dias após huPBMC/dose nº 1
huPBMC + PBS
huPBMC + 16432, 3 mg/kg
huPBMC + 28543, 0,1 mg/kg
huPBMC + 28532, 0,1 mg/kg
huPBMC + 28543, 0,1 mg/kg + 16432, 3 mg/kg
huPBMC + 28532, 0,1 mg/kg + 16432, 3 mg/kg

Figura 61

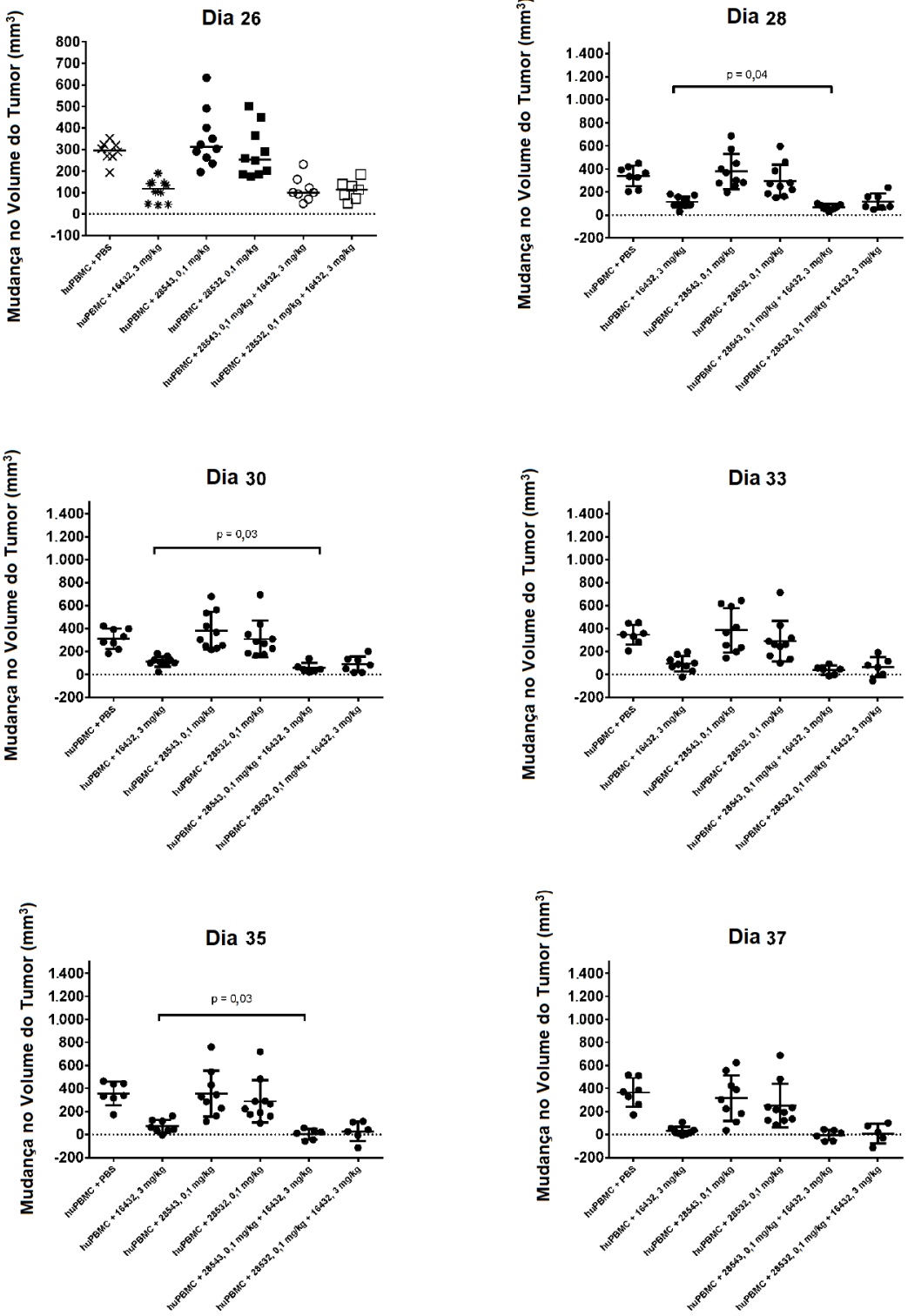

Dia 26
Dia 28
Dia 30
Dia 33
Dia 35
Dia 37
Mudança no Volume do Tumor (mm³)
p = 0,04
p = 0,03
p = 0,03
huPBMC + PBS
huPBMC + 16432, 3 mg/kg
huPBMC + 28543, 0,1 mg/kg
huPBMC + 28532, 0,1 mg/kg
huPBMC + 28543, 0,1 mg/kg + 16432, 3 mg/kg
huPBMC + 28532, 0,1 mg/kg + 16432, 3 mg/kg

Figura 62

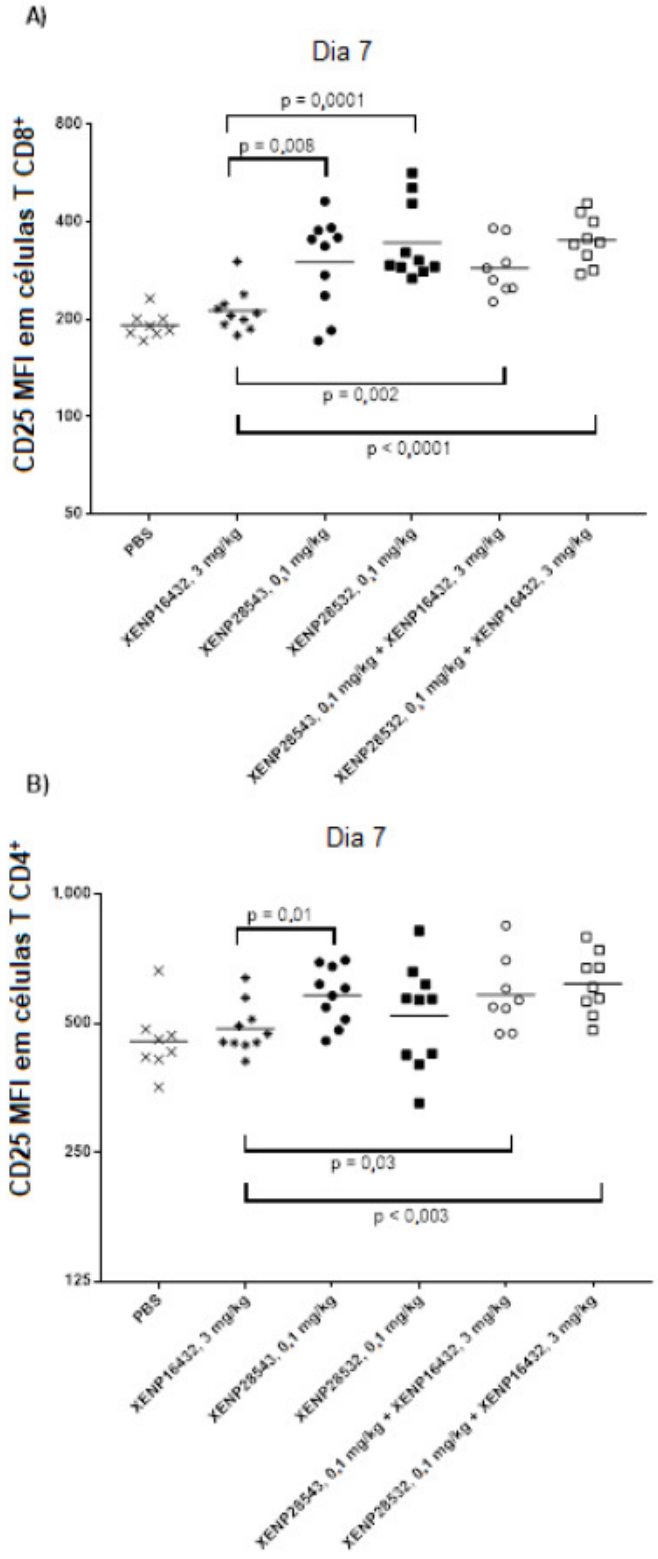

A)
Dia 7
CD25 MFI em células T CD8+
800
400
200
100
50
p = 0,0001
p = 0,008
p = 0,002
p < 0,0001
PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP28543, 0,1 mg/kg
XENP28532, 0,1 mg/kg
XENP28543, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP28532, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
B)
Dia 7
CD25 MFI em células T CD4+
1.000
500
250
125
p = 0,01
p = 0,03
p < 0,003
PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP28543, 0,1 mg/kg
XENP28532, 0,1 mg/kg
XENP28543, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP28532, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg

Figura 63

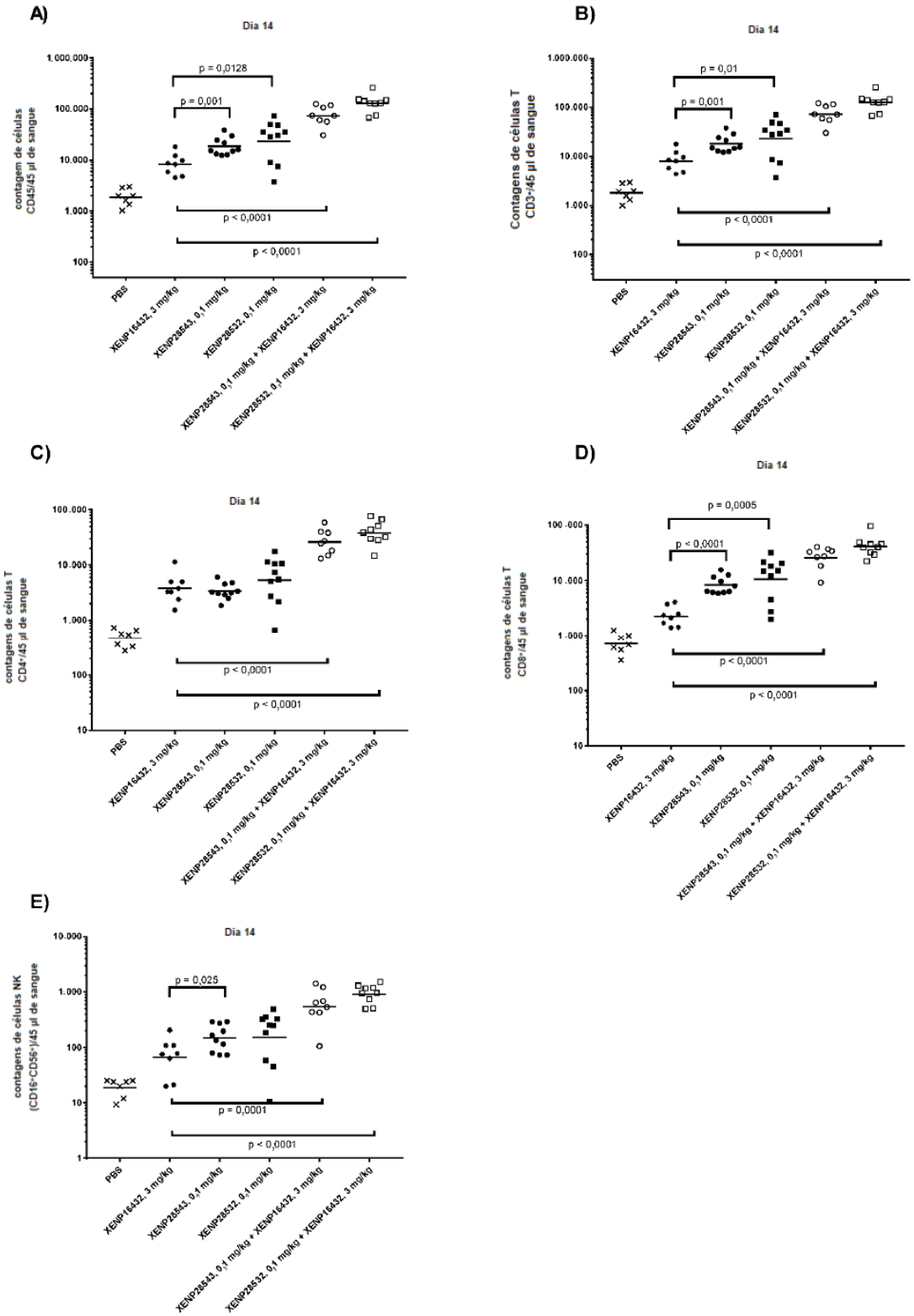

A)
Dia 14
contagem de células CD45/45 µl de sangue
p = 0,0128
p = 0,001
p < 0,0001
p < 0,0001
B)
Dia 14
Contagens de células T CD3+/45 µl de sangue
p = 0,01
p = 0,001
p < 0,0001
p < 0,0001
C)
Dia 14
contagens de células T CD4+/45 µl de sangue
p < 0,0001
p < 0,0001
D)
Dia 14
contagens de células T CD8+/45 µl de sangue
p = 0,0005
p < 0,0001
p < 0,0001
p < 0,0001
E)
Dia 14
contagens de células NK (CD16+CD56+)/45 µl de sangue
p = 0,025
p = 0,0001
p < 0,0001
PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP28543, 0,1 mg/kg
XENP28532, 0,1 mg/kg
XENP28543, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP28532, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg

Figura 64

>XENP29724 mAb C[PD1]_H1_L1.1_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia Pesada - mAb C[PD1]_H1_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 559)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia Leve - mAb C[PD1]_L1.1 (SEQ ID NO: 560)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP29726 mAb C[PD1]_H1_L1.3_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia Pesada - mAb C[PD1]_H1_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 561)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia Leve - mAb C[PD1]_L1.3 (SEQ ID NO: 562)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP29768 mAb C[PD1]_H1_L1.45_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia Pesada - mAb C[PD1]_H1_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 563)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia Leve - mAb C[PD1]_L1.45 (SEQ ID NO: 564)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP29840 mAb C[PD1]_H1_L1.117_IgG1_PVA_/S267K

Cadeia Pesada - mAb C[PD1]_H1_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 565)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia Leve - mAb C[PD1]_L1.117 (SEQ ID NO: 566)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYTYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 65A

Descrição de variante mAb C[PD-1]	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	Aprimoramento de dobra em WT
H1L1	WT		3,82E-08	1,12E+05	4,28E-03	1,00
H1.1_L1	VH-S30T	30T	3,21E-08	1,27E+05	4,07E-03	1,19
H1.2_L1	VH-S30A	30A	3,56E-08	1,21E+05	4,32E-03	1,07
H1.3_L1	VH-S30Q	30Q	4,00E-08	1,18E+05	4,72E-03	0,96
H1.4_L1	VH-S30G	30G	3,40E-08	1,24E+05	4,22E-03	1,12
H1.5_L1	VH-S30V	30V	3,74E-08	1,27E+05	4,75E-03	1,02
H1.6_L1	VH-S30H	30H	4,85E-08	1,09E+05	5,29E-03	0,79
H1.7_L1	VH-S30K	30K	5,25E-08	1,04E+05	5,45E-03	0,73
H1.8_L1	VH-S30Y	30Y	5,13E-08	1,04E+05	5,34E-03	0,74
H1.9_L1	VH-S31T	31T	4,69E-08	1,21E+05	5,67E-03	0,81
H1.10_L1	VH-S31A	31A	3,69E-08	1,15E+05	4,25E-03	1,03
H1.11_L1	VH-S31Q	31Q	3,68E-08	1,23E+05	4,54E-03	1,04
H1.12_L1	VH-S31G	31G	4,42E-08	1,22E+05	5,37E-03	0,87
H1.13_L1	VH-S31V	31V	5,02E-08	1,26E+05	6,34E-03	0,76
H1.14_L1	VH-S31H	31H	4,58E-08	1,19E+05	5,46E-03	0,83
H1.15_L1	VH-S31D	31D	4,00E-08	1,39E+05	5,57E-03	0,95
H1.16_L1	VH-S31K	31K	4,71E-08	1,09E+05	5,14E-03	0,81
H1.17_L1	VH-S31Y	31Y	5,04E-08	1,06E+05	5,34E-03	0,76
H1.18_L1	VH-F34Y	32Y	4,79E-08	1,25E+05	5,97E-03	0,80
H1.19_L1	VH-F34L	32L	1,67E-08	1,30E+05	2,17E-03	2,29
H1.20_L1	VH-F34W	32W	1,62E-07	1,26E+05	2,04E-02	0,24
H1.21_L1	VH-F34I	32I	2,72E-08	1,37E+05	3,71E-03	1,41
H1.22_L1	VH-F34H	32H	3,40E-08	1,05E+05	3,58E-03	1,12
H1.23_L1	VH-F34Q	32Q	7,34E-08	1,18E+05	8,63E-03	0,52
H1.24_L1	VH-F34S	32S	5,49E-08	1,25E+05	6,88E-03	0,70
H1.25_L1	VH-F34K	32K	1,13E-07	1,07E+05	1,20E-02	0,34
H1.26_L1	VH-G35A	33A	1,93E-07	1,87E+05	3,60E-02	0,20
H1.27_L1	VH-G35S	33S	1,04E-07	1,37E+05	1,42E-02	0,37
H1.28_L1	VH-G35T	33T	9,27E-08	3,01E+05	2,79E-02	0,41
H1.29_L1	VH-G35N	33N	2,23E-07	1,96E+05	4,37E-02	0,17
H1.30_L1	VH-G35H	33H	7,64E-08	3,37E+05	2,57E-02	0,50
H1.31_L1	VH-G35D	33D	5,64E-08	7,11E+05	4,01E-02	0,68
H1.32_L1	VH-G35K	33K	N/A			N/A
H1.33_L1	VH-G35L	33L	N/A			N/A
H1.34_L1	VH-G35Y	33Y	N/A			N/A
H1.35_L1	VH-H37N	35N	N/A			N/A
H1.36_L1	VH-S54T	52T	3,74E-07	1,23E+05	4,60E-02	0,10

Figura 65B

Descrição de variante mAb C[PD-1]	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_a (1/s)	Aprimoramento de dobra em WT
H1.37_L1	VH-S54A	52A	5,60E-08	1,36E+05	7,63E-03	0,68
H1.38_L1	VH-S54Q	52Q	5,75E-08	1,35E+05	7,76E-03	0,66
H1.39_L1	VH-S54G	52G	1,15E-07	1,54E+05	1,78E-02	0,33
H1.40_L1	VH-S54V	52V	2,31E-07	1,27E+05	2,93E-02	0,17
H1.41_L1	VH-S54H	52H	7,46E-08	1,40E+05	1,04E-02	0,51
H1.42_L1	VH-S54K	52K	5,00E-07	5,30E+04	2,65E-02	0,08
H1.43_L1	VH-S54Y	52Y	6,65E-07	2,23E+05	1,48E-01	0,06
H1.44_L1	VH-S54E	52E	1,83E-07	1,23E+05	2,25E-02	0,21
H1.45_L1	VH-S55T	52aT	7,45E-08	1,22E+05	9,10E-03	0,51
H1.46_L1	VH-S55A	52aA	4,19E-08	1,26E+05	5,29E-03	0,91
H1.47_L1	VH-S55Q	52aQ	1,17E-07	1,36E+05	1,59E-02	0,33
H1.48_L1	VH-S55G	52aG	2,01E-08	1,46E+05	2,93E-03	1,90
H1.49_L1	VH-S55V	52aV	9,28E-08	1,47E+05	1,36E-02	0,41
H1.50_L1	VH-S55H	52aH	2,42E-08	1,19E+05	2,87E-03	1,58
H1.51_L1	VH-S55K	52aK	5,49E-08	1,03E+05	5,67E-03	0,70
H1.52_L1	VH-S55Y	52aY	3,31E-08	1,28E+05	4,23E-03	1,15
H1.53_L1	VH-S55E	52aE	9,60E-08	2,95E+05	2,83E-02	0,40
H1.54_L1	VH-G56A	53A	3,45E-08	1,25E+05	4,32E-03	1,11
H1.55_L1	VH-G56S	53S	3,39E-08	1,35E+05	4,57E-03	1,13
H1.56_L1	VH-G56T	53T	3,15E-08	1,29E+05	4,07E-03	1,21
H1.57_L1	VH-G56Q	53Q	3,09E-08	1,50E+05	4,64E-03	1,24
H1.58_L1	VH-G56H	53	4,39E-08	1,24E+05	5,44E-03	0,87
H1.59_L1	VH-G56K	53	3,76E-08	1,31E+05	4,94E-03	1,02
H1.60_L1	VH-G56L	53	3,59E-08	1,28E+05	4,58E-03	1,06
H1.61_L1	VH-G56Y	53	4,15E-08	1,38E+05	5,74E-03	0,92
H1.62_L1	VH-S59T	54	5,99E-08	1,29E+05	7,74E-03	0,64
H1.63_L1	VH-S59A	54	4,24E-08	1,46E+05	6,19E-03	0,90
H1.64_L1	VH-S59Q	54	5,91E-08	1,32E+05	7,83E-03	0,65
H1.65_L1	VH-S59G	54	6,10E-08	1,36E+05	8,27E-03	0,63
H1.66_L1	VH-S59V	54	1,12E-07	1,15E+05	1,29E-02	0,34
H1.67_L1	VH-S59H	54	4,92E-08	1,41E+05	6,92E-03	0,78
H1.68_L1	VH-S59K	54	7,40E-08	1,09E+05	8,08E-03	0,52
H1.69_L1	VH-S59Y	54	5,96E-08	1,37E+05	8,18E-03	0,64
H1.70_L1	VH-S59E	54	4,80E-08	1,40E+05	6,74E-03	0,80
H1.71_L1	VH-S60T	55	4,58E-08	1,10E+05	5,05E-03	0,83
H1.72_L1	VH-S60A	55	6,247E-08	1,12E+05	7,01E-03	0,61
H1L1	WT		4,07E-08	1,49E+05	6,05E-03	1,00

Figura 65C

Descrição de variante mAb C[PD-1]	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	Aprimoramento de dobra em WT
H1.73_L1	VH-S60Q	55	2,827E-08	1,30E+05	3,67E-03	1,44
H1.74_L1	VH-S60G	55	5,701E-08	1,65E+05	9,40E-03	0,71
H1.75_L1	VH-S60V	55	5,258E-08	1,52E+05	8,01E-03	0,77
H1.76_L1	VH-S60H	55	5,088E-08	1,50E+05	7,61E-03	0,80
H1.77_L1	VH-S60D	55	3,59E-08	1,52E+05	5,46E-03	1,13
H1.78_L1	VH-S60K	55	1,744E-07	1,34E+05	2,33E-02	0,23
H1.79_L1	VH-S60Y	55	4,342E-08	1,58E+05	6,86E-03	0,94
H1.80_L1	VH-I61V	56	2,066E-07	2,26E+05	4,66E-02	0,20
H1.81_L1	VH-I61L	56	N/A			N/A
H1.82_L1	VH-I61F	56	N/A			N/A
H1.83_L1	VH-I61T	56	N/A			N/A
H1.84_L1	VH-I61W	56	N/A			N/A
H1.85_L1	VH-I61A	56	1,323E-07	4,67E+05	6,18E-02	0,31
H1.86_L1	VH-I61N	56	N/A			N/A
H1.87_L1	VH-I61E	56	N/A			N/A
H1.88_L1	VH-I61K	56	N/A			N/A
H1.89_L1	VH-I62V	57	4,317E-08	1,55E+05	6,69E-03	0,94
H1.90_L1	VH-I62L	57	5,149E-08	1,41E+05	7,27E-03	0,79
H1.91_L1	VH-I62F	57	6,1E-08	1,50E+05	9,17E-03	0,67
H1.92_L1	VH-I62T	57	4,777E-08	1,78E+05	8,51E-03	0,85
H1.93_L1	VH-I62W	57	3,104E-08	1,70E+05	5,28E-03	1,31
H1.94_L1	VH-I62A	57	8,06E-08	2,00E+05	1,61E-02	0,50
H1.95_L1	VH-I62N	57	7,339E-08	1,62E+05	1,19E-02	0,55
H1.96_L1	VH-I62E	57	4,157E-08	1,81E+05	7,51E-03	0,98
H1.97_L1	VH-I62K	57	1,135E-07	1,54E+05	1,75E-02	0,36
H1.98_L1	VH-Y63F	58	N/A			N/A
H1.99_L1	VH-Y63H	58	2,609E-07	2,50E+05	6,51E-02	0,16
H1.100_L1	VH-Y63L	58	N/A			N/A
H1.101_L1	VH-Y63W	58	N/A			N/A
H1.102_L1	VH-Y63V	58	N/A			N/A
H1.103_L1	VH-Y63A	58	N/A			N/A
H1.104_L1	VH-Y63Q	58	4,113E-07	1,24E+06	5,11E-01	0,10
H1.105_L1	VH-Y63D	58	5,102E-07	4,97E+05	2,54E-01	0,08
H1.106_L1	VH-Y63K	58	N/A			N/A
H1.107_L1	VH-G103A	95	N/A			N/A
H1.108_L1	VH-G103S	95	2,066E-07	1,70E+05	3,51E-02	0,20
H1.109_L1	VH-G103T	95	N/A			N/A

Figura 65D

Descrição de variante mAb C[PD-1]	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	Aprimoramento de dobra em WT
H1.110_L1	VH-G103Q	95	N/A			N/A
H1.111_L1	VH-G103H	95	N/A			N/A
H1.112_L1	VH-G103K	95	N/A			N/A
H1.113_L1	VH-G103L	95	N/A			N/A
H1.114_L1	VH-G103Y	95	5,919E-07	1,48E+05	8,75E-02	0,07
H1.115_L1	VH-G108A	96	7,674E-08	1,51E+05	1,16E-02	0,53
H1.116_L1	VH-G108S	96	1,832E-07	1,90E+05	3,47E-02	0,22
H1.117_L1	VH-G108T	96	1,207E-07	8,69E+04	1,05E-02	0,34
H1.118_L1	VH-G108Q	96	1,924E-07	1,64E+05	3,16E-02	0,21
H1.119_L1	VH-G108H	96	1,861E-07	2,02E+05	3,76E-02	0,22
H1.120_L1	VH-G108D	96	N/A			N/A
H1.121_L1	VH-G108K	96	N/A			N/A
H1.122_L1	VH-G108L	96	N/A			N/A
H1.123_L1	VH-G108Y	96	3,501E-07	1,54E+05	5,38E-02	0,12
H1.124_L1	VH-R109K	97	4,88E-08	1,38E+05	6,74E-03	0,83
H1.125_L1	VH-R109E	97	1,872E-08	2,78E+05	5,20E-03	2,17
H1.126_L1	VH-R109D	97	4,308E-08	2,54E+05	1,09E-02	0,94
H1.127_L1	VH-R109H	97	3,082E-08	1,88E+05	5,78E-03	1,32
H1.128_L1	VH-R109S	97	3,275E-08	1,86E+05	6,08E-03	1,24
H1.129_L1	VH-R109G	97	4,319E-08	1,67E+05	7,19E-03	0,94
H1.130_L1	VH-R109Y	97	2,215E-08	2,28E+05	5,05E-03	1,84
H1.131_L1	VH-R109I	97	4,353E-08	2,02E+05	8,78E-03	0,93
H1.132_L1	VH-R109W	97	9,631E-09	2,27E+05	2,18E-03	4,23
H1.133_L1	VH-L110I	98	4,947E-08	1,52E+05	7,53E-03	0,82
H1.134_L1	VH-L110F	98	6,079E-08	1,45E+05	8,80E-03	0,67
H1.135_L1	VH-L110V	98	4,669E-08	1,47E+05	6,85E-03	0,87
H1.136_L1	VH-L110Y	98	5,45E-08	1,58E+05	8,63E-03	0,75
H1.137_L1	VH-L110W	98	3,264E-08	1,72E+05	5,60E-03	1,25
H1.138_L1	VH-L110D	98	1,162E-07	1,10E+05	1,28E-02	0,35
H1.139_L1	VH-L110A	98	9,894E-08	1,11E+05	1,10E-02	0,41
H1.140_L1	VH-L110Q	98	N/A			N/A
H1.141_L1	VH-L110K	98	1,175E-07	1,12E+05	1,32E-02	0,35
H1.142_L1	VH-V111T	99	8,796E-08	1,34E+05	1,18E-02	0,46
H1.143_L1	VH-V111I	99	3,561E-08	1,78E+05	6,33E-03	1,14
H1.144_L1	VH-V111L	99	1,301E-07	1,34E+05	1,74E-02	0,31
H1.145_L1	VH-V111A	99	1,099E-07	1,61E+05	1,77E-02	0,37
H1.146_L1	VH-V111Y	99	1,015E-07	1,55E+05	1,57E-02	0,40

Figura 65E

Descrição de variante mAb C[PD-1]	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	Aprimoramento de dobra em WT
H1.147_L1	VH-V111Q	99	9,234E-08	1,40E+05	1,30E-02	0,44
H1.148_L1	VH-V111W	99	7,755E-08	1,44E+05	1,12E-02	0,52
H1.149_L1	VH-V111D	99	1,163E-07	9,97E+04	1,16E-02	0,35
H1.150_L1	VH-V111K	99	6,001E-08	8,72E+04	5,24E-03	0,68
H1.151_L1	VH-W112F	100	3,09E-07	2,82E+05	8,70E-02	0,13
H1.152_L1	VH-W112L	100	3,01E-07	3,26E+05	9,81E-02	0,14
H1.153_L1	VH-W112Y	100	N/A			N/A
H1.154_L1	VH-W112I	100	N/A			N/A
H1.155_L1	VH-W112H	100	N/A			N/A
H1.156_L1	VH-W112Q	100	N/A			N/A
H1.157_L1	VH-W112S	100	N/A			N/A
H1.158_L1	VH-W112E	100	N/A			N/A
H1.159_L1	VH-W112R	100	N/A			N/A
H1.160_L1	VH-S113T	100a	9,068E-08	8,43E+04	7,64E-03	0,45
H1.161_L1	VH-S113A	100a	4,753E-08	1,59E+05	7,55E-03	0,86
H1.162_L1	VH-S113Q	100a	N/A			N/A
H1.163_L1	VH-S113G	100a	9,196E-08	1,23E+05	1,13E-02	0,44
H1.164_L1	VH-S113V	100a	2,8E-07	5,94E+04	1,66E-02	0,15
H1.165_L1	VH-S113H	100a	N/A			N/A
H1.166_L1	VH-S113D	100a	1,888E-07	2,42E+05	4,57E-02	0,22
H1.167_L1	VH-S113K	100a	N/A			N/A
H1.168_L1	VH-S113Y	100a	N/A			N/A
H1_L1.1	VL-N31H	27d	5,464E-09	9,73E+04	5,32E-04	7,45
H1_L1.2	VL-N31E	27d	1,519E-07	1,50E+05	2,28E-02	0,27
H1_L1.3	VL-N31S	27d	1,083E-08	1,53E+05	1,65E-03	3,76
H1_L1.4	VL-N31R	27d	N/A			N/A
H1_L1.5	VL-N31L	27d	3,294E-08	1,73E+05	5,69E-03	1,24
H1_L1.6	VL-N31T	27d	6,46E-08	1,20E+05	7,77E-03	0,63
H1_L1.7	VL-N31G	27d	8,462E-08	1,03E+05	8,75E-03	0,48
H1_L1.8	VL-N31Y	27d	3,069E-07	8,06E+04	2,47E-02	0,13
H1_L1.9	VL-S32T	27e	4,666E-08	1,07E+05	5,00E-03	0,87
H1_L1.10	VL-S32A	27e	8,287E-08	9,10E+04	7,55E-03	0,49
H1_L1.11	VL-S32Q	27e	1,033E-07	9,65E+04	9,97E-03	0,39
H1_L1.12	VL-S32V	27e	1,108E-07	1,04E+05	1,15E-02	0,37
H1_L1.13	VL-S32H	27e	1,033E-07	1,02E+05	1,06E-02	0,39
H1_L1.14	VL-S32K	27e	1,696E-07	8,32E+04	1,41E-02	0,24
H1_L1.15	VL-S32Y	27e	1,073E-07	9,08E+04	9,75E-03	0,38

Figura 65F

Descrição de variante mAb C[PD-1]	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	Aprimoramento de dobra em WT
H1_L1.16	VL-G33A	27f	1,289E-07	1,02E+05	1,32E-02	0,32
H1_L1.17	VL-G33Q	27f	1,81E-07	1,29E+05	2,34E-02	0,22
H1_L1.18	VL-G33H	27f	2,05E-07	1,23E+05	2,52E-02	0,20
H1_L1.19	VL-G33D	27f	2,059E-07	1,43E+05	2,95E-02	0,20
H1_L1.20	VL-G33K	27f	7,311E-08	1,84E+05	1,34E-02	0,56
H1_L1.21	VL-G33L	27f	3,566E-07	1,39E+05	4,95E-02	0,11
H1_L1.22	VL-G33Y	27f	2,714E-07	9,91E+04	2,69E-02	0,15
H1_L1.23	VL-N34D	28	5,763E-08	1,04E+05	6,00E-03	0,71
H1_L1.24	VL-N34H	28	1,998E-07	9,16E+04	1,83E-02	0,20
H1_L1.25	VL-N34E	28	1,521E-07	8,09E+04	1,23E-02	0,27
H1_L1.26	VL-N34S	28	1,771E-07	1,30E+05	2,29E-02	0,23
H1_L1.27	VL-N34R	28	5,155E-08	2,27E+05	1,17E-02	0,79
H1_L1.28	VL-N34L	28	4,032E-07	1,34E+05	5,39E-02	0,10
H1_L1.29	VL-N34T	28	3,051E-07	1,33E+05	4,05E-02	0,13
H1_L1.30	VL-N34G	28	6,186E-08	1,46E+05	9,01E-03	0,66
H1_L1.31	VL-N34Y	28	N/A			N/A
H1_L1.32	VL-Q35E	29	3,503E-08	1,36E+05	4,76E-03	1,16
H1_L1.33	VL-Q35H	29	4,268E-08	1,33E+05	5,66E-03	0,95
H1_L1.34	VL-Q35N	29	4,209E-08	1,07E+05	4,51E-03	0,97
H1_L1.35	VL-Q35K	29	5,757E-08	1,11E+05	6,38E-03	0,71
H1_L1.36	VL-Q35A	29	6,091E-08	1,11E+05	6,78E-03	0,67
H1_L1.37	VL-Q35F	29	2,898E-08	1,26E+05	3,64E-03	1,40
H1_L1.38	VL-Q35I	29	3,049E-08	1,44E+05	4,39E-03	1,33
H1_L1.39	VL-K36R	30	5,45E-08	1,09E+05	5,96E-03	0,75
H1_L1.40	VL-K36E	30	3,806E-08	1,20E+05	4,55E-03	1,07
H1_L1.41	VL-K36H	30	3,967E-08	1,28E+05	5,08E-03	1,03
H1_L1.42	VL-K36D	30	3,653E-08	1,34E+05	4,90E-03	1,11
H1_L1.43	VL-K36A	30	3,98E-08	1,37E+05	5,46E-03	1,02
H1_L1.44	VL-K36G	30	1,995E-08	1,46E+05	2,91E-03	2,04
H1_L1.45	VL-K36Y	30	8,602E-09	1,57E+05	1,35E-03	4,73
H1_L1.46	VL-K36I	30	2,637E-08	1,23E+05	3,24E-03	1,54
H1_L1.47	VL-N37D	31	2,375E-08	1,49E+05	3,53E-03	1,71
H1_L1.48	VL-N37H	31	8,012E-08	9,80E+04	7,85E-03	0,51
H1_L1.49	VL-N37E	31	6,115E-08	1,14E+05	6,97E-03	0,67
H1_L1.50	VL-N37S	31	4,214E-08	9,71E+04	4,09E-03	0,97
H1_L1.51	VL-N37R	31	4,259E-08	1,11E+05	4,73E-03	0,96
H1_L1.52	VL-N37L	31	5,023E-08	1,11E+05	5,59E-03	0,81

Figura 65G

Descrição de variante mAb C[PD-1]	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	Aprimoramento de dobra em WT
H1_L1.53	VL-N37T	31	5,181E-08	9,31E+04	4,83E-03	0,79
H1_L1.54	VL-N37G	31	6,67E-08	1,13E+05	7,53E-03	0,61
H1_L1.55	VL-N37Y	31	8,036E-08	1,17E+05	9,42E-03	0,51
H1_L1.56	VL-Y38F	32	1,96E-07	1,31E+05	2,56E-02	0,21
H1_L1.57	VL-Y38H	32	1,569E-07	1,77E+05	2,78E-02	0,26
H1_L1.58	VL-Y38L	32	N/A			N/A
H1_L1.59	VL-Y38W	32	N/A			N/A
H1_L1.60	VL-Y38V	32	N/A			N/A
H1_L1.61	VL-Y38A	32	N/A			N/A
H1_L1.62	VL-Y38Q	32	N/A			N/A
H1_L1.63	VL-Y38D	32	N/A			N/A
H1_L1.64	VL-Y38K	32	N/A			N/A
H1_L1.65	VL-T40A	34	9,803E-08	9,68E+04	9,49E-03	0,42
H1_L1.66	VL-W56F	50	3,527E-08	9,62E+04	3,39E-03	1,15
H1_L1.67	VL-W56L	50	4,165E-08	1,00E+05	4,18E-03	0,98
H1_L1.68	VL-W56Y	50	1,784E-07	9,29E+04	1,66E-02	0,23
H1_L1.69	VL-W56I	50	2,586E-08	9,44E+04	2,44E-03	1,57
H1_L1.70	VL-W56H	50	3,091E-08	9,07E+04	2,81E-03	1,32
H1_L1.71	VL-W56Q	50	4,711E-08	9,14E+04	4,30E-03	0,86
H1_L1.72	VL-W56S	50	6,026E-08	5,77E+04	3,48E-03	0,68
H1_L1.73	VL-W56D	50	5,161E-08	8,81E+04	4,55E-03	0,79
H1_L1.74	VL-W56R	50	2,646E-07	9,23E+04	2,44E-02	0,15
H1_L1.75	VL-T59V	53	4,529E-08	1,10E+05	4,96E-03	0,90
H1_L1.76	VL-T59S	53	5,499E-08	9,31E+04	5,12E-03	0,74
H1_L1.77	VL-T59A	53	5,027E-08	1,06E+05	5,35E-03	0,81
H1_L1.78	VL-T59I	53	5,679E-08	1,02E+05	5,81E-03	0,72
H1_L1.79	VL-T59Q	53	5,548E-08	1,32E+05	7,31E-03	0,73
H1_L1.80	VL-T59H	53	5,104E-08	1,13E+05	5,78E-03	0,80
H1_L1.81	VL-T59D	53	5,135E-08	1,18E+05	6,06E-03	0,79
H1_L1.82	VL-T59K	53	5,261E-08	1,14E+05	6,02E-03	0,77
H1_L1.83	VL-T59Y	53	6,427E-08	9,38E+04	6,03E-03	0,63
H1_L1.84	VL-E61Q	55	4,601E-08	1,04E+05	4,78E-03	0,88
H1_L1.85	VL-E61K	55	3,18E-08	9,94E+04	3,16E-03	1,28
H1_L1.86	VL-E61S	55	4,06E-08	1,16E+05	4,70E-03	1,00
H1_L1.87	VL-E61H	55	5,085E-08	1,09E+05	5,52E-03	0,80
H1_L1.88	VL-E61A	55	4,328E-08	9,50E+04	4,11E-03	0,94
H1_L1.89	VL-E61G	55	4,388E-08	9,19E+04	4,03E-03	0,93

Figura 65H

Descrição de variante mAb C[PD-1]	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_d (1/s)	Aprimoramento de dobra em WT
H1_L1.90	VL-E61F	55	7,882E-08	9,67E+04	7,62E-03	0,52
H1_L1.91	VL-E61I	55	6,125E-08	8,43E+04	5,16E-03	0,66
H1_L1.92	VL-S62T	56	5,379E-08	1,05E+05	5,62E-03	0,76
H1_L1.93	VL-S62A	56	5,386E-08	1,03E+05	5,53E-03	0,76
H1_L1.94	VL-S62Q	56	7,002E-08	1,08E+05	7,54E-03	0,58
H1_L1.95	VL-S62V	56	6,58E-08	1,28E+05	8,41E-03	0,62
H1_L1.96	VL-S62H	56	3,358E-08	1,50E+05	5,04E-03	1,21
H1_L1.97	VL-S62K	56	3,262E-08	1,32E+05	4,30E-03	1,25
H1_L1.98	VL-S62Y	56	3,387E-08	1,59E+05	5,40E-03	1,20
H1_L1.99	VL-T69S	63	3,21E-08	1,51E+05	4,83E-03	1,27
H1_L1.100	VL-D97Q	91	N/A			N/A
H1_L1.101	VL-D97E	91	6,962E-08	1,28E+05	8,92E-03	0,58
H1_L1.102	VL-D97H	91	N/A			N/A
H1_L1.103	VL-D97S	91	N/A			N/A
H1_L1.104	VL-D97R	91	N/A			N/A
H1_L1.105	VL-D97L	91	N/A			N/A
H1_L1.106	VL-D97T	91	3,236E-07	2,77E+05	8,96E-02	0,13
H1_L1.107	VL-D97G	91	N/A			N/A
H1_L1.108	VL-D97Y	91	N/A			N/A
H1_L1.109	VL-Y98F	92	6,694E-08	1,46E+05	9,78E-03	0,61
H1_L1.110	VL-Y98H	92	1,123E-07	1,52E+05	1,70E-02	0,36
H1_L1.111	VL-Y98L	92	8,078E-08	1,44E+05	1,16E-02	0,50
H1_L1.112	VL-Y98W	92	7,415E-08	1,71E+05	1,27E-02	0,55
H1_L1.113	VL-Y98V	92	N/A			N/A
H1_L1.114	VL-Y98A	92	N/A			N/A
H1_L1.115	VL-Y98Q	92	N/A			N/A
H1_L1.116	VL-Y98K	92	1,533E-07	1,78E+05	2,73E-02	0,27
H1_L1.117	VL-S99T	93	1,563E-08	1,61E+05	2,51E-03	2,60
H1_L1.118	VL-S99A	93	7,512E-08	1,40E+05	1,05E-02	0,54
H1_L1.119	VL-S99Q	93	2,119E-08	1,49E+05	3,15E-03	1,92
H1_L1.120	VL-S99G	93	6,686E-08	1,82E+05	1,22E-02	0,61
H1_L1.121	VL-S99V	93	1,681E-08	1,43E+05	2,41E-03	2,42
H1_L1.122	VL-S99H	93	1,501E-08	1,34E+05	2,02E-03	2,71
H1_L1.123	VL-S99D	93	N/A			N/A
H1_L1.124	VL-S99K	93	1,059E-07	1,43E+05	1,52E-02	0,38
H1_L1.125	VL-S99F	93	7,62E-08	1,65E+05	1,26E-02	0,53
H1_L1.126	VL-Y100F	94	2,63E-08	1,61E+05	4,24E-03	1,55

Figura 65I

Descrição de variante mAb C[PD-1]	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	Aprimoramento de dobra em WT
H1_L1.127	VL-Y100H	94	5,552E-08	1,33E+05	7,41E-03	0,73
H1_L1.128	VL-Y100L	94	1,86E-07	4,90E+05	9,11E-02	0,22
H1_L1.129	VL-Y100W	94	9,435E-09	1,06E+05	1,00E-03	4,31
H1_L1.130	VL-Y100V	94	N/A			N/A
H1_L1.131	VL-Y100A	94	N/A			N/A
H1_L1.132	VL-Y100Q	94	3,70E-08	1,66E+05	6,15E-03	1,10
H1_L1.133	VL-Y100D	94	4,049E-07	6,51E+04	2,64E-02	0,10
H1_L1.134	VL-Y100K	94	9,13E-08	1,68E+05	1,53E-02	0,45

Figura 66

Descrição (no contexto de IL15/Rα-Fc direcionada a PD-1)	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
H1L1 (XENP28543)	WT		6,71E-08	1,04E+05	6,95E-03
H1_L1.1 (XENP30046)	VL-N31H	VL-27d	5,40E-09	9,04E+04	4,88E-04
H1.19_L1.1 (XENP30269)	VH-F34L VL-N31H	VH-32 VL-27d	2,29E-09	7,44E+04	1,70E-04
H1.132_L1.1 (XENP30272)	VH-R109W VL-N31H	VH-97 VL-27d	3,13E-09	1,33E+05	4,18E-04

Figura 67

Descrição de variante mAb C (no contexto de IL15/Rα-Fc direcionada a PD-1)	Substituição (Xencor nº)	Posição de Kabat	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
H1L1 (XENP29483)	WT		5,88E-08	8,92E+04	0,00525
H1_L1.1 (XENP30049)	VL-N31H	VL-27d	5,30E-09	6,16E+04	3,27E-04
H1.19_L1.1 (XENP30275)	VH-F34L VL-N31H	VH-32 VL-27d	4,35E-09	6,26E+04	2,72E-04
H1.169_L1.1 (XENP30273)	VH-F34L/S55G VL-N31H	VH-32/52A VL-27d	3,10E-09	6,20E+04	1,93E-04
H1.175_L1.1 (XENP30274)	VH-F34L/S55G/R109W VL-N31H	VH-32/52A/97 VL-27d	1,24E-09	9,50E+04	1,18E-04
H1_L1.140 (XENP30449)	VL-N31H/K36Y/S99T	VL-27d/30/93	1,62E-09	7,48E+04	1,22E-04
H1_L1.135 (XENP30444)	VL-N31H/K36Y	VL-27d/30	2,84E-09	7,02E+04	2,00E-04
H1_L1.136 (XENP30445)	N31H/S99T	VL-27d/93	2,02E-09	5,98E+04	1,21E-04
H1.132_L1.135 (XENP30486)	VH-R109W VL-N31H/K36Y	VH-97 VL-27d/30	8,28E-10	1,36E+05	1,12E-04
H1.132_L1.140 (XENP30487)	VH-R109W VL-N31H/K36Y/S99T	VH-97 VL-N27dH/K30Y/S93T	5,43E-10	1,45E+05	7,88E-05
H1.175_L1.135 (XENP30488)	VH-F34L/S55G/R109W VL-N31H/K36Y	VH-32/52A/97 VL-27d/30	6,97E-10	1,20E+05	8,33E-05
H1.175_L1.140 (XENP30489)	VH-F34L/S55G/R109W VL-N31H/K36Y/S99T	VH-32/52A/97 VL-27d/30/93	6,24E-10	1,26E+05	7,88E-05

Figura 68A

>XENP30046 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 567)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 568)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.1 (SEQ ID NO: 569)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30047 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.3_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 570)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 571)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.3 (SEQ ID NO: 572)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 68B

>XENP30049 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 573)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

GGGGS/*NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*

TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK

SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 574)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL

RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT

PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ

PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.1 (SEQ ID NO: 575)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA

EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE

QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30050 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.3_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 576)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

GGGGS/*NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*

TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK

SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 577)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL

RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT

PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ

PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.3 (SEQ ID NO: 578)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA

EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE

QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 68C

>XENP30269 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1.19_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 579)
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1.19_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 580)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C_L1.1 (SEQ ID NO: 581)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30272 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1.132_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 582)
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1.132_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 583)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGWLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.1 (SEQ ID NO: 584)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 68D

>XENP30273 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1.169_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 585)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*

TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1.169_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 586)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLGMHWVRQAPGKGLEWVSYISGGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C_L1.1 (SEQ ID NO: 587)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30274 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1.175_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 588)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*

TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1.175_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 589)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLGMHWVRQAPGKGLEWVSYISGGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGWLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C_L1.1 (SEQ ID NO: 590)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 68E

>XENP30275 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1.19_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 591)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1.19_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 592)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C_L1.1 (SEQ ID NO: 593)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30444 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.135_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 594)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 595)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.135 (SEQ ID NO: 596)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 68F

>XENP30445 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.136_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 597)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 598)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C_L1.136 (SEQ ID NO: 599)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYTYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30449 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.140_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 600)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 601)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.140 (SEQ ID NO: 602)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYTYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 68G

>XENP30486 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1.132_L1.135_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 603)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS*/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1.132_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 604)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGWLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C_L1.135 (SEQ ID NO: 605)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30487 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1.132_L1.140_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 606)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS*/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1.132_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 607)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGWLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.140 (SEQ ID NO: 608)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYTYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 68H

>XENP30488 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1.175_L1.135_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 609)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1.175_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 610)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLGMHWVRQAPGKGLEWVSYISGGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGWLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C_L1.135 (SEQ ID NO: 611)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30489 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1.175_L1.140_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 612)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGS/*NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV*
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1.175_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 613)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLGMHWVRQAPGKGLEWVSYISGGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGWLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C_L1.140 (SEQ ID NO: 614)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQYNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYTYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 69A

>XENP30290 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 615)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 616)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL
HEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.1 (SEQ ID NO: 617)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30291 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.3_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(N4D/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 618)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVDVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 619)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL
HEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.3 (SEQ ID NO: 620)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 69B

>XENP30292 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.1_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 621)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 622)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.1 (SEQ ID NO: 623)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30293 human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)-mAb C[PD-1]_H1_L1.3_IgG1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

Cadeia 1 - human_IL15Ra(sushi)_(GGGGS)5-human_IL15(D30N/N65D;single-chain)_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 624)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS/NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 2 - mAb C[PD-1]_H1_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 625)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRLVWSPDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadeia 3 - mAb C[PD-1]_L1.3 (SEQ ID NO: 626)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 70

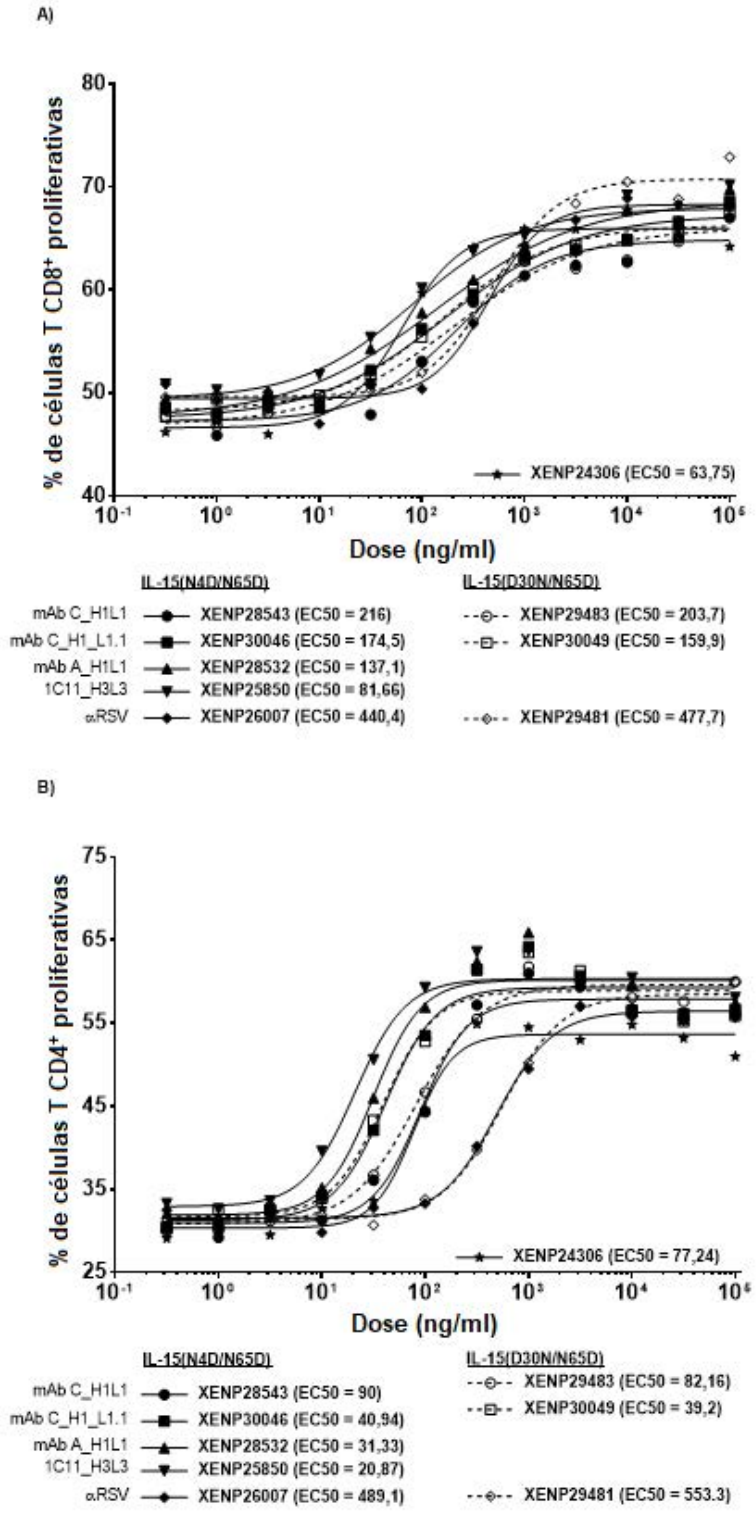
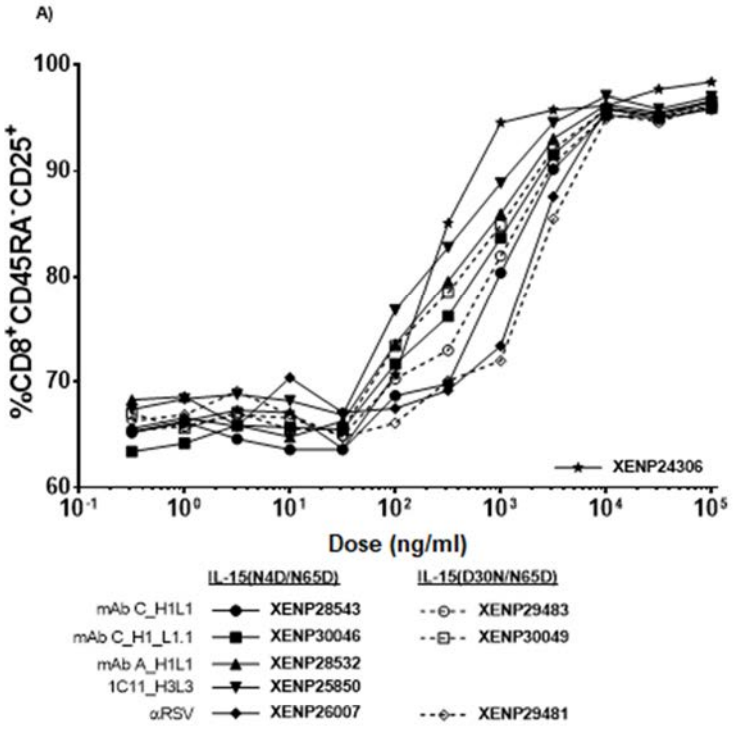

A)
% de células T CD8+ proliferativas
Dose (ng/ml)
XENP24306 (EC50 = 63,75)
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1 XENP28543 (EC50 = 216)
mAb C_H1_L1.1 XENP30046 (EC50 = 174,5)
mAb A_H1L1 XENP28532 (EC50 = 137,1)
1C11_H3L3 XENP25850 (EC50 = 81,66)
αRSV XENP26007 (EC50 = 440,4)
XENP29483 (EC50 = 203,7)
XENP30049 (EC50 = 159,9)
XENP29481 (EC50 = 477,7)
B)
% de células T CD4+ proliferativas
Dose (ng/ml)
XENP24306 (EC50 = 77,24)
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1 XENP28543 (EC50 = 90)
mAb C_H1_L1.1 XENP30046 (EC50 = 40,94)
mAb A_H1L1 XENP28532 (EC50 = 31,33)
1C11_H3L3 XENP25850 (EC50 = 20,87)
αRSV XENP26007 (EC50 = 489,1)
XENP29483 (EC50 = 82,16)
XENP30049 (EC50 = 39,2)
XENP29481 (EC50 = 553.3)

Figura 71


A)
%CD8+CD45RA-CD25+
Dose (ng/ml)
XENP24306
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1 XENP28543
mAb C_H1_L1.1 XENP30046
mAb A_H1L1 XENP28532
1C11_H3L3 XENP25850
αRSV XENP26007
XENP29483
XENP30049
XENP29481

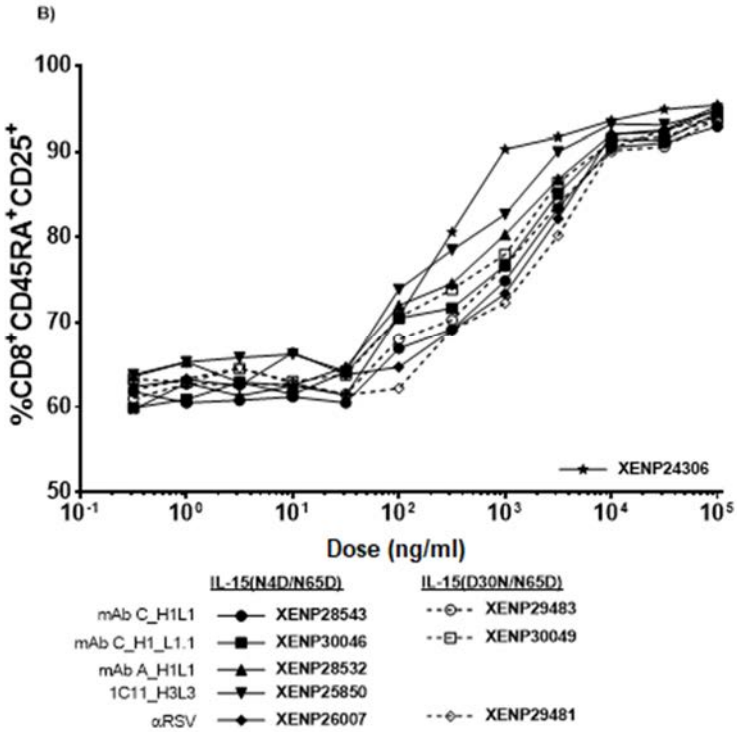
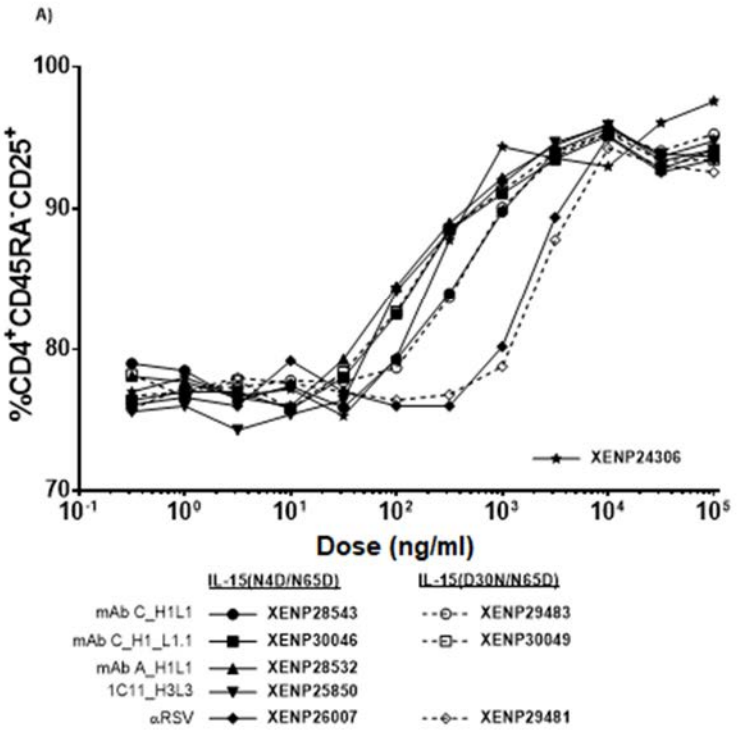

B)
%CD8+CD45RA+CD25+
Dose (ng/ml)
XENP24306
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1 XENP28543
mAb C_H1_L1.1 XENP30046
mAb A_H1L1 XENP28532
1C11_H3L3 XENP25850
αRSV XENP26007
XENP29483
XENP30049
XENP29481

Figura 72


A)
%CD4+CD45RA-CD25+
100
90
80
70
10-1
100
101
102
103
104
105
Dose (ng/ml)
XENP24306
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1
XENP28543
XENP29483
mAb C_H1_L1.1
XENP30046
XENP30049
mAb A_H1L1
XENP28532
1C11_H3L3
XENP25850
αRSV
XENP26007
XENP29481

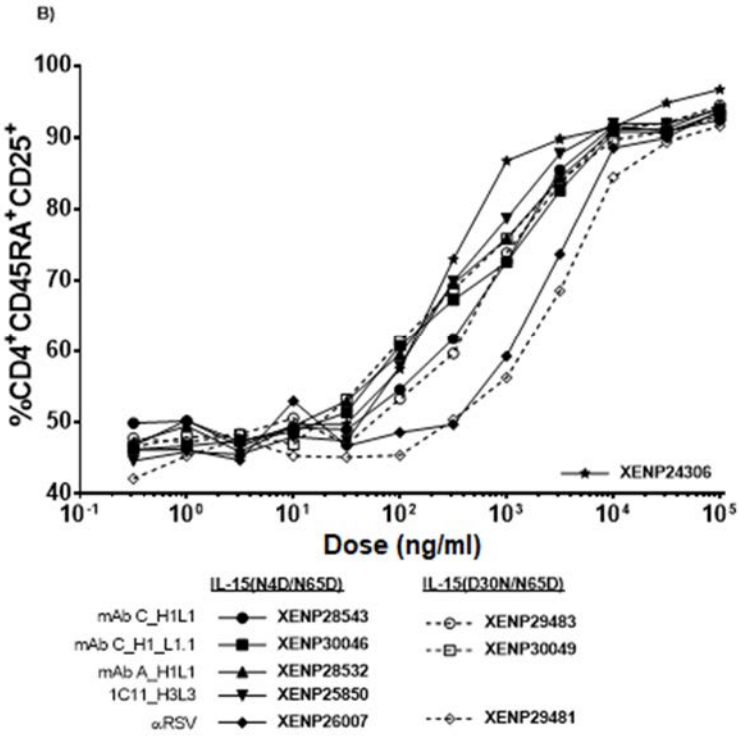

B)
%CD4+CD45RA+CD25+
100
90
80
70
60
50
40
10-1
100
101
102
103
104
105
Dose (ng/ml)
XENP24306
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1
XENP28543
XENP29483
mAb C_H1_L1.1
XENP30046
XENP30049
mAb A_H1L1
XENP28532
1C11_H3L3
XENP25850
αRSV
XENP26007
XENP29481

Figura 73

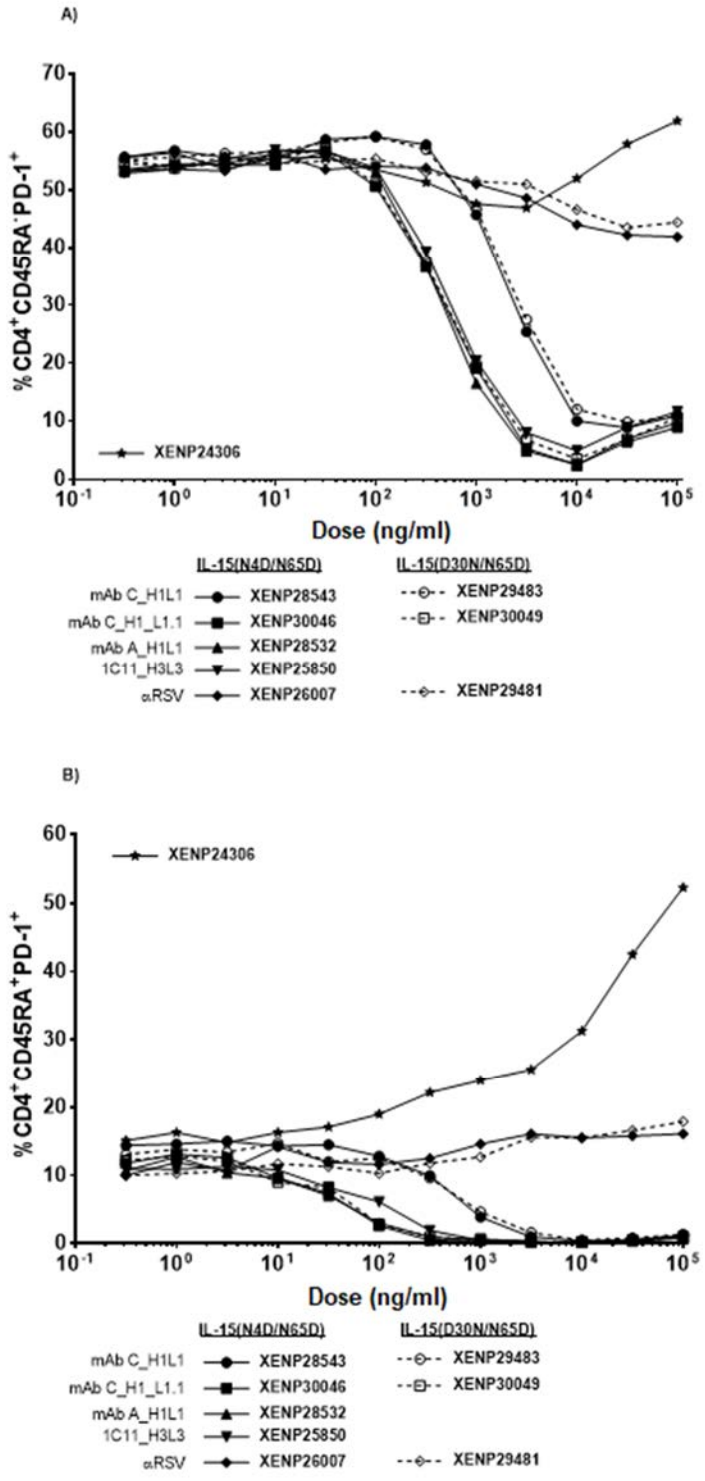

A)
% CD4+CD45RA-PD-1+
Dose (ng/ml)
XENP24306
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1 XENP28543
mAb C_H1_L1.1 XENP30046
mAb A_H1L1 XENP28532
1C11_H3L3 XENP25850
αRSV XENP26007
XENP29483
XENP30049
XENP29481
B)
% CD4+CD45RA+PD-1+
Dose (ng/ml)
XENP24306
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1 XENP28543
mAb C_H1_L1.1 XENP30046
mAb A_H1L1 XENP28532
1C11_H3L3 XENP25850
αRSV XENP26007
XENP29483
XENP30049
XENP29481

Figura 74

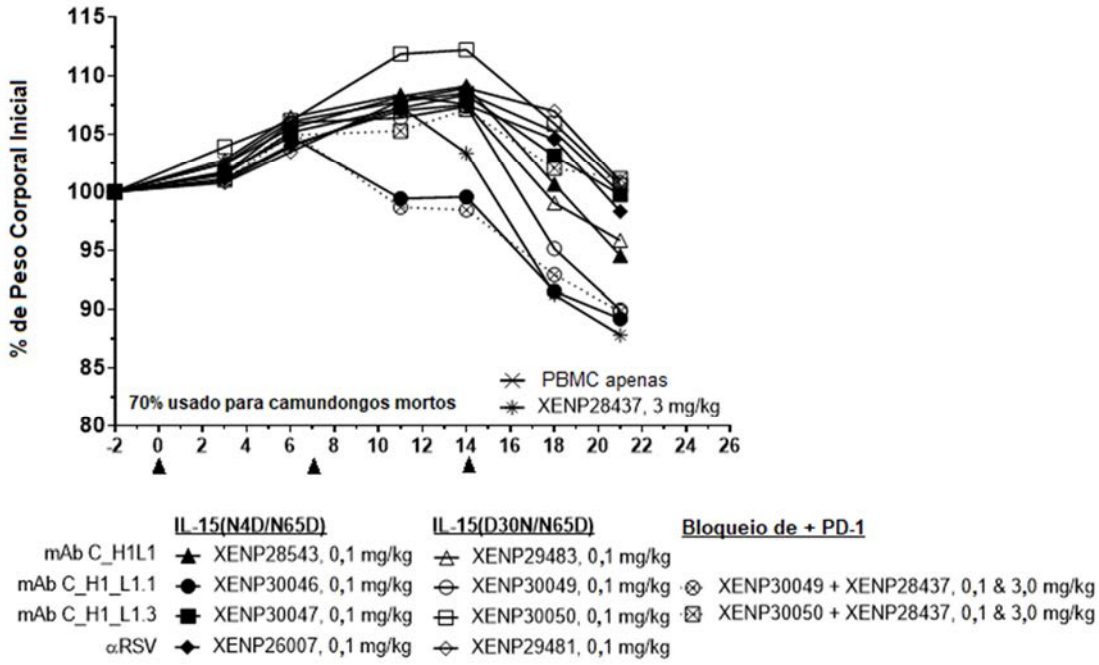

% de Peso Corporal Inicial
115
110
105
100
95
90
85
80
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
70% usado para camundongos mortos
PBMC apenas
XENP28437, 3 mg/kg
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
Bloqueio de + PD-1
mAb C_H1L1
XENP28543, 0,1 mg/kg
XENP29483, 0,1 mg/kg
mAb C_H1_L1.1
XENP30046, 0,1 mg/kg
XENP30049, 0,1 mg/kg
XENP30049 + XENP28437, 0,1 & 3,0 mg/kg
mAb C_H1_L1.3
XENP30047, 0,1 mg/kg
XENP30050, 0,1 mg/kg
XENP30050 + XENP28437, 0,1 & 3,0 mg/kg
αRSV
XENP26007, 0,1 mg/kg
XENP29481, 0,1 mg/kg

Figura 75

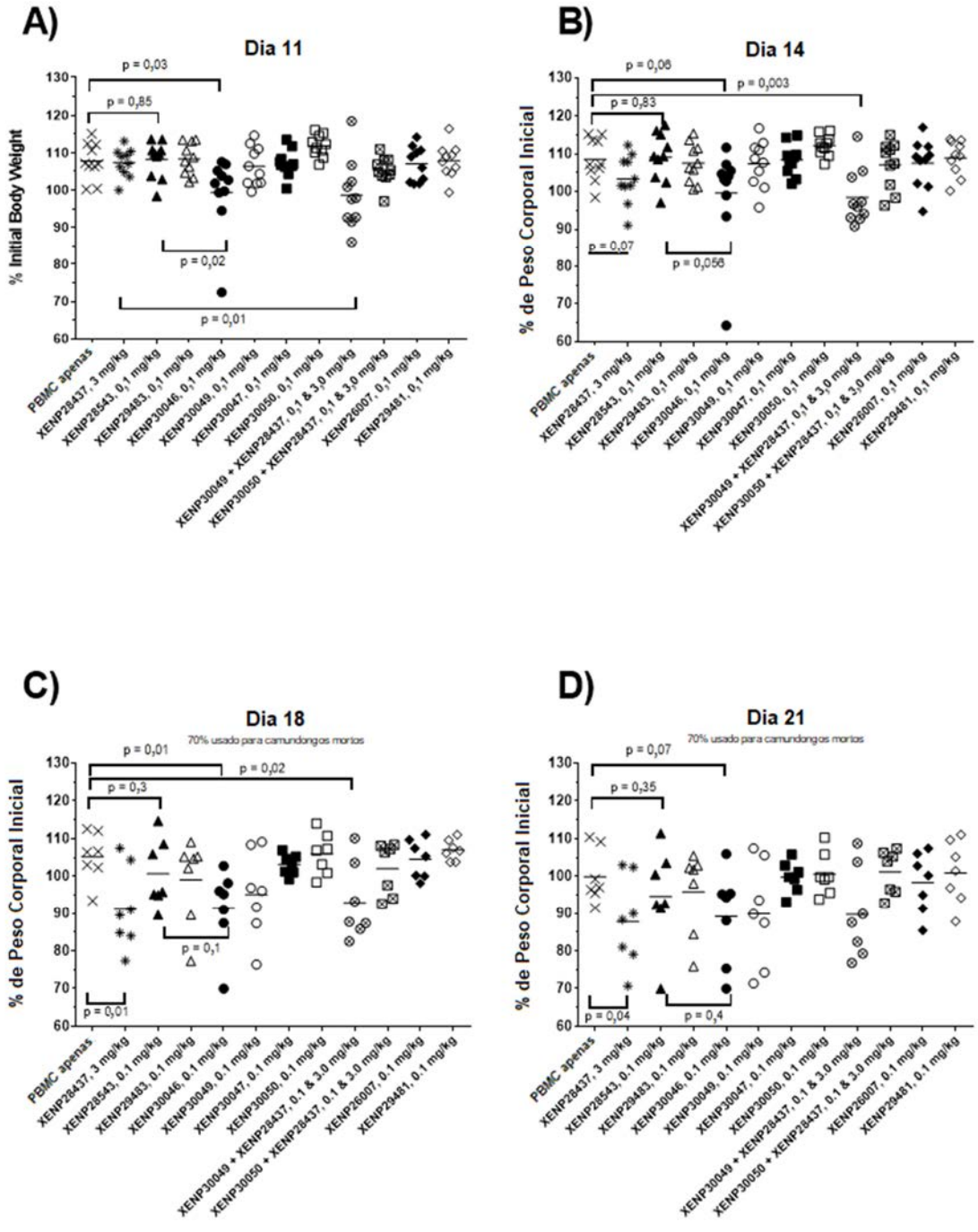

A)
Dia 11
% Initial Body Weight
p = 0,03
p = 0,85
p = 0,02
p = 0,01
B)
Dia 14
% de Peso Corporal Inicial
p = 0,06
p = 0,003
p = 0,83
p = 0,07
p = 0,056
C)
Dia 18
70% usado para camundongos mortos
% de Peso Corporal Inicial
p = 0,01
p = 0,02
p = 0,3
p = 0,1
p = 0,01
D)
Dia 21
70% usado para camundongos mortos
% de Peso Corporal Inicial
p = 0,07
p = 0,35
p = 0,04
p = 0,4
PBMC apenas
XENP28437, 3 mg/kg
XENP28543, 0,1 mg/kg
XENP29483, 0,1 mg/kg
XENP30046, 0,1 mg/kg
XENP30049, 0,1 mg/kg
XENP30047, 0,1 mg/kg
XENP30050, 0,1 mg/kg
XENP30049 + XENP28437, 0,1 & 3,0 mg/kg
XENP30050 + XENP28437, 0,1 & 3,0 mg/kg
XENP26007, 0,1 mg/kg
XENP29481, 0,1 mg/kg

Figura 76A

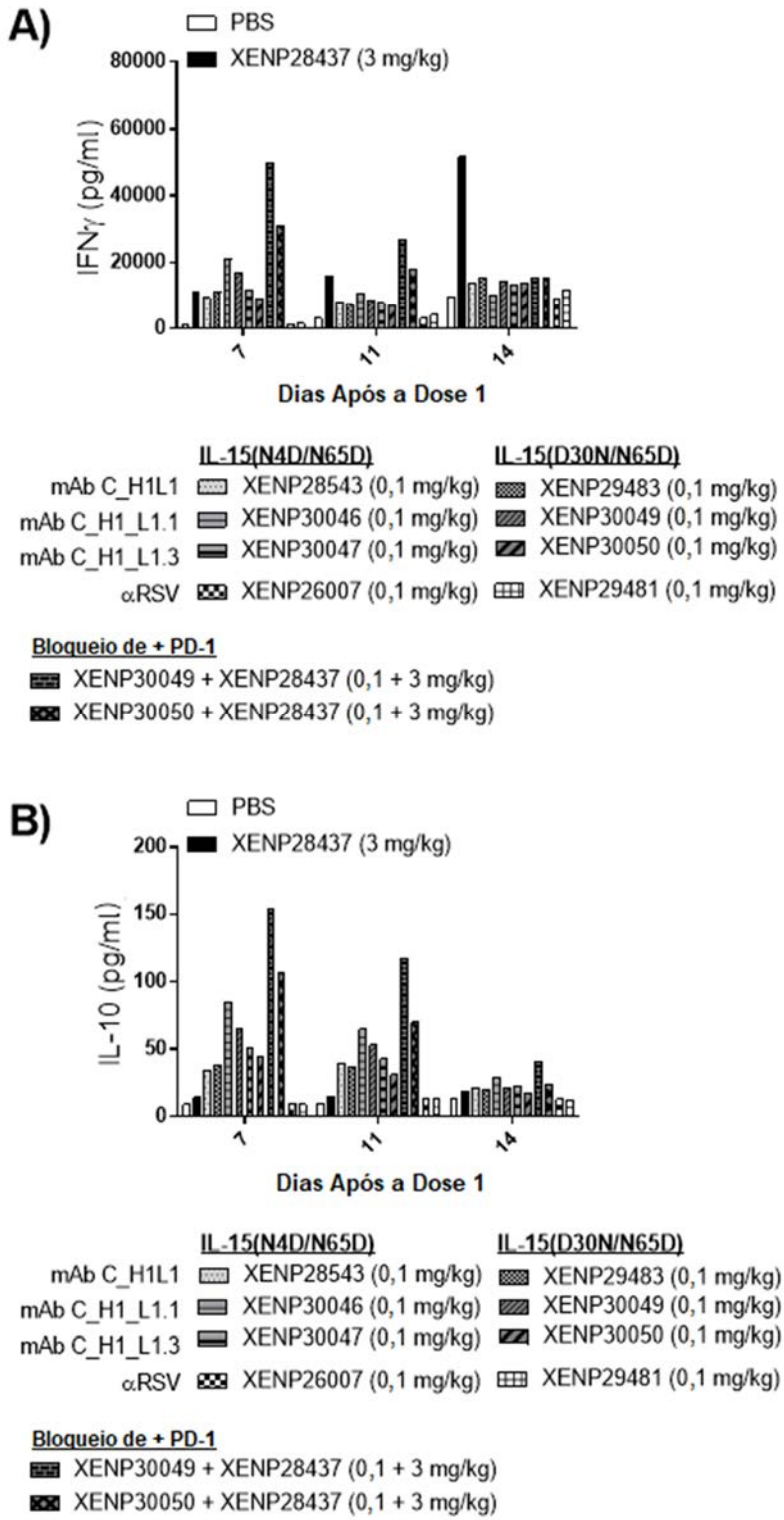

A)
PBS
XENP28437 (3 mg/kg)
80000
60000
40000
20000
0
IFNγ (pg/ml)
7
11
14
Dias Após a Dose 1
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1
XENP28543 (0,1 mg/kg)
XENP29483 (0,1 mg/kg)
mAb C_H1_L1.1
XENP30046 (0,1 mg/kg)
XENP30049 (0,1 mg/kg)
mAb C_H1_L1.3
XENP30047 (0,1 mg/kg)
XENP30050 (0,1 mg/kg)
αRSV
XENP26007 (0,1 mg/kg)
XENP29481 (0,1 mg/kg)
Bloqueio de + PD-1
XENP30049 + XENP28437 (0,1 + 3 mg/kg)
XENP30050 + XENP28437 (0,1 + 3 mg/kg)
B)
PBS
XENP28437 (3 mg/kg)
200
150
100
50
0
IL-10 (pg/ml)
7
11
14
Dias Após a Dose 1
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1
XENP28543 (0,1 mg/kg)
XENP29483 (0,1 mg/kg)
mAb C_H1_L1.1
XENP30046 (0,1 mg/kg)
XENP30049 (0,1 mg/kg)
mAb C_H1_L1.3
XENP30047 (0,1 mg/kg)
XENP30050 (0,1 mg/kg)
αRSV
XENP26007 (0,1 mg/kg)
XENP29481 (0,1 mg/kg)
Bloqueio de + PD-1
XENP30049 + XENP28437 (0,1 + 3 mg/kg)
XENP30050 + XENP28437 (0,1 + 3 mg/kg)

Figura 76C

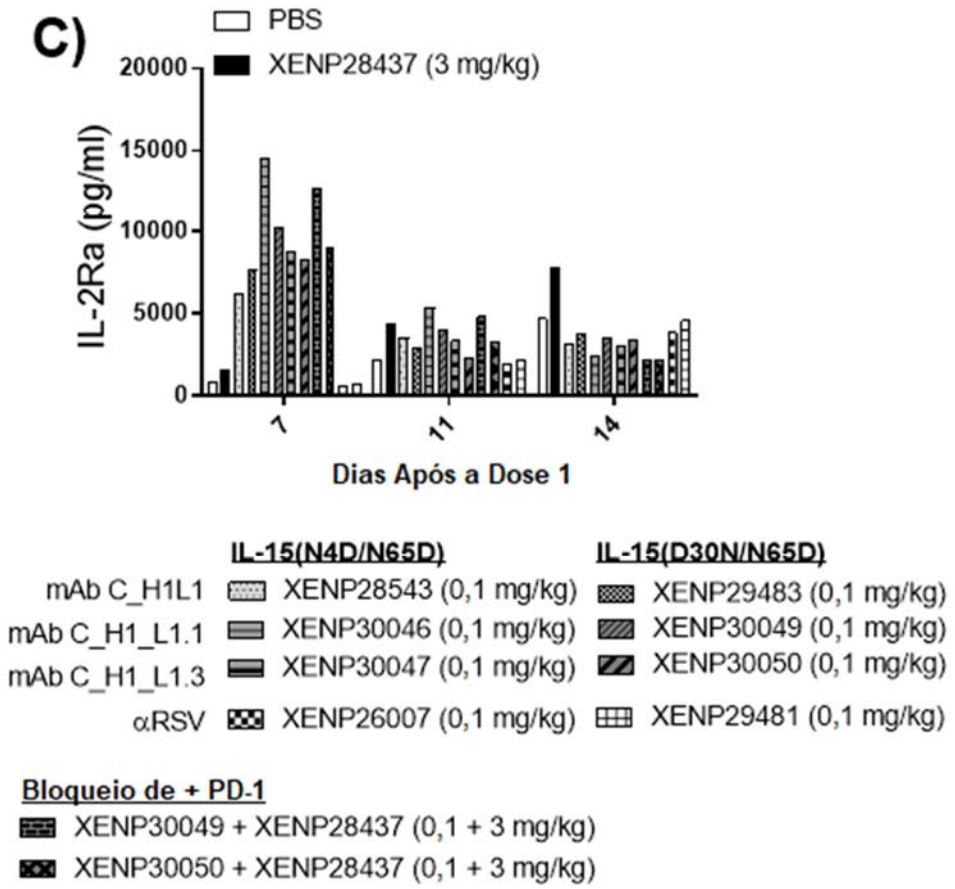

C)
PBS
XENP28437 (3 mg/kg)
IL-2Ra (pg/ml)
20000
15000
10000
5000
0
7
11
14
Dias Após a Dose 1
IL-15(N4D/N65D)
IL-15(D30N/N65D)
mAb C_H1L1
XENP28543 (0,1 mg/kg)
XENP29483 (0,1 mg/kg)
mAb C_H1_L1.1
XENP30046 (0,1 mg/kg)
XENP30049 (0,1 mg/kg)
mAb C_H1_L1.3
XENP30047 (0,1 mg/kg)
XENP30050 (0,1 mg/kg)
αRSV
XENP26007 (0,1 mg/kg)
XENP29481 (0,1 mg/kg)
Bloqueio de + PD-1
XENP30049 + XENP28437 (0,1 + 3 mg/kg)
XENP30050 + XENP28437 (0,1 + 3 mg/kg)

Figura 77

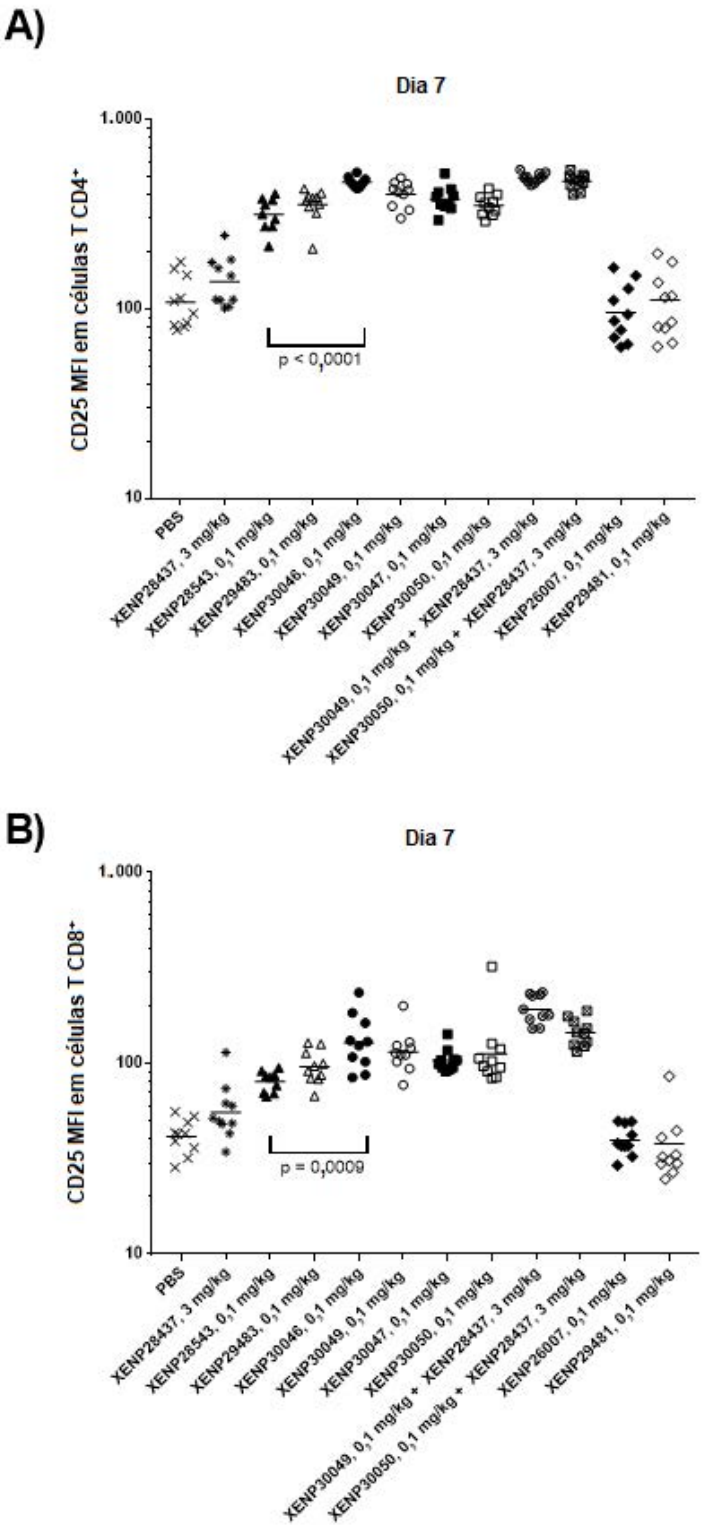

A)
Dia 7
CD25 MFI em células T CD4+
1.000
100
10
p < 0,0001
PBS
XENP28437, 3 mg/kg
XENP28543, 0,1 mg/kg
XENP29483, 0,1 mg/kg
XENP30046, 0,1 mg/kg
XENP30049, 0,1 mg/kg
XENP30047, 0,1 mg/kg
XENP30050, 0,1 mg/kg
XENP30049, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
XENP30050, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
XENP26007, 0,1 mg/kg
XENP29481, 0,1 mg/kg
B)
Dia 7
CD25 MFI em células T CD8+
1.000
100
10
p = 0,0009
PBS
XENP28437, 3 mg/kg
XENP28543, 0,1 mg/kg
XENP29483, 0,1 mg/kg
XENP30046, 0,1 mg/kg
XENP30049, 0,1 mg/kg
XENP30047, 0,1 mg/kg
XENP30050, 0,1 mg/kg
XENP30049, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
XENP30050, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
XENP26007, 0,1 mg/kg
XENP29481, 0,1 mg/kg

Figura 78

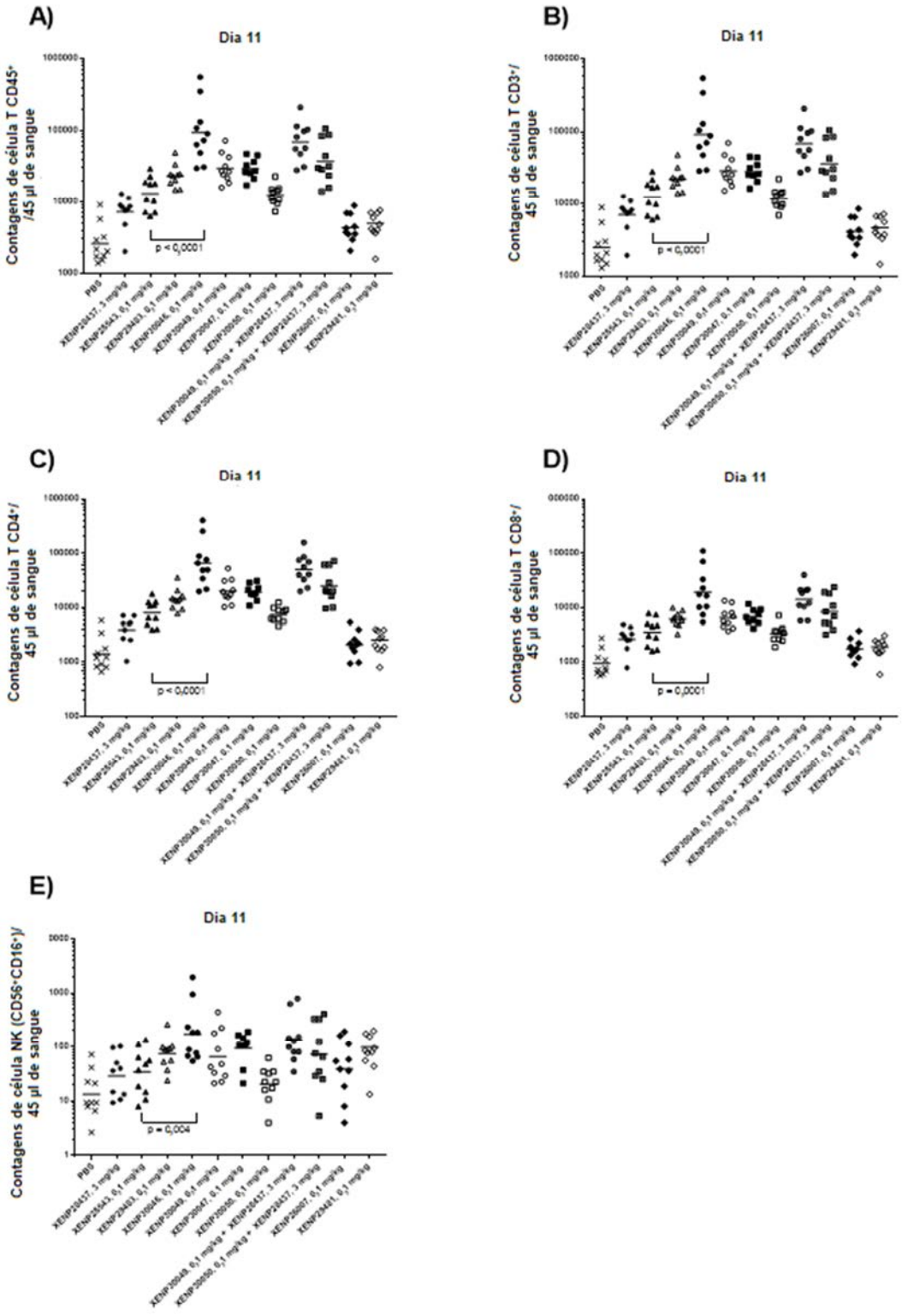

A)
Dia 11
Contagens de célula T CD45+ /45 µl de sangue
p < 0,0001
B)
Dia 11
Contagens de célula T CD3+/ 45 µl de sangue
p < 0,0001
C)
Dia 11
Contagens de célula T CD4+/ 45 µl de sangue
p < 0,0001
D)
Dia 11
Contagens de célula T CD8+/ 45 µl de sangue
p = 0,0001
E)
Dia 11
Contagens de célula NK (CD56+CD16+)/ 45 µl de sangue
p = 0,004
PBS
XENP25437, 3 mg/kg
XENP25643, 0,1 mg/kg
XENP23483, 0,1 mg/kg
XENP20646, 0,1 mg/kg
XENP20649, 0,1 mg/kg
XENP20647, 0,1 mg/kg
XENP20650, 0,1 mg/kg
XENP25437, 3 mg/kg
XENP25007, 0,1 mg/kg
XENP23481, 0,1 mg/kg
XENP20649, 0,1 mg/kg + XENP25437, 3 mg/kg
XENP20650, 0,1 mg/kg + XENP25437, 3 mg/kg

Figura 79

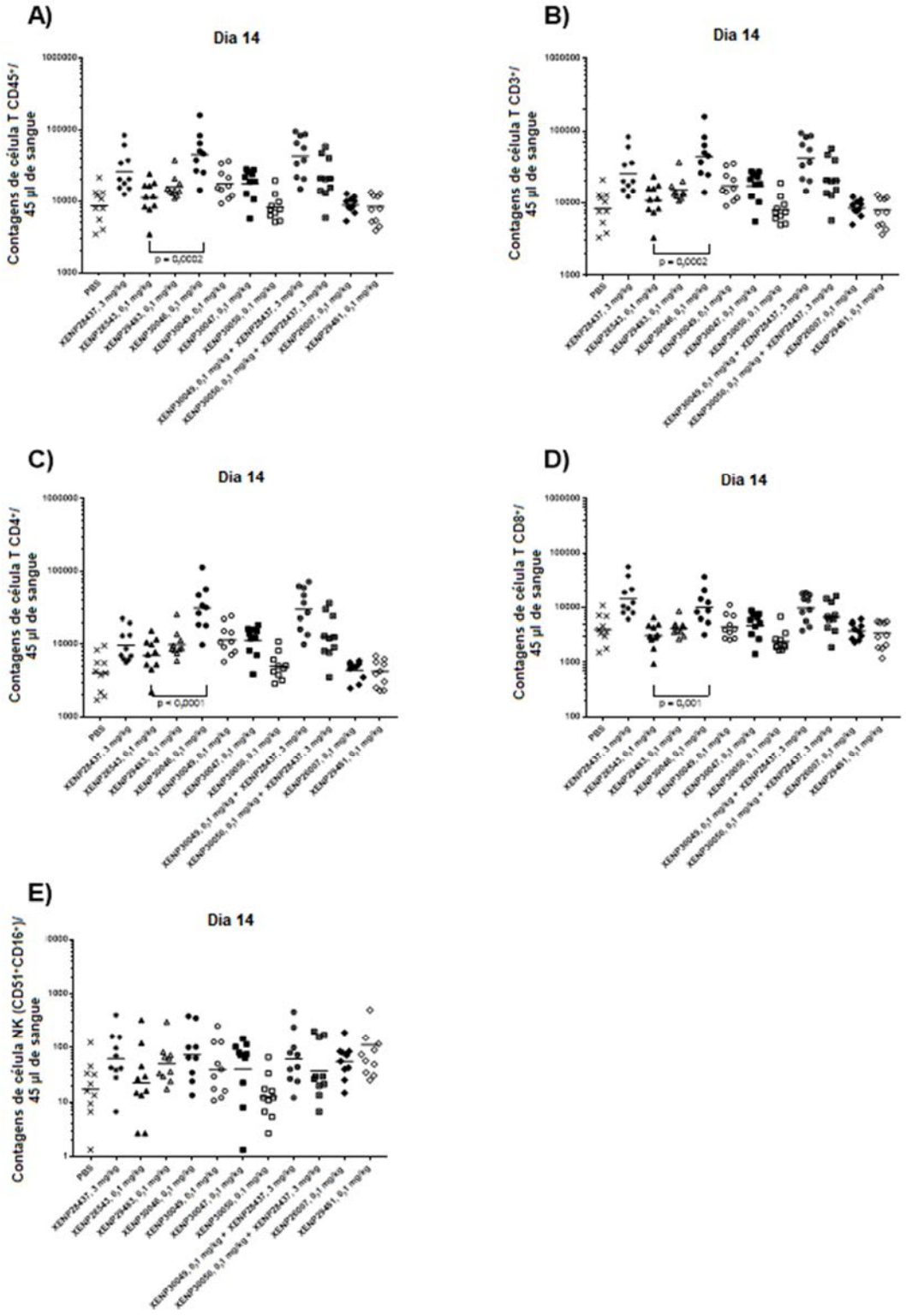

A)
Dia 14
Contagens de célula T CD45+/ 45 µl de sangue
p = 0,0002
B)
Dia 14
Contagens de célula T CD3+/ 45 µl de sangue
p = 0,0002
C)
Dia 14
Contagens de célula T CD4+/ 45 µl de sangue
p = 0,0001
D)
Dia 14
Contagens de célula T CD8+/ 45 µl de sangue
p = 0,001
E)
Dia 14
Contagens de célula NK (CD51+CD16+)/ 45 µl de sangue
PBS
XENP28437, 3 mg/kg
XENP26543, 0,1 mg/kg
XENP29483, 0,1 mg/kg
XENP30046, 0,1 mg/kg
XENP30049, 0,1 mg/kg
XENP30047, 0,1 mg/kg
XENP30050, 0,1 mg/kg
XENP30049, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
XENP30050, 0,1 mg/kg + XENP28437, 3 mg/kg
XENP26097, 0,1 mg/kg
XENP29481, 0,1 mg/kg

Figura 80

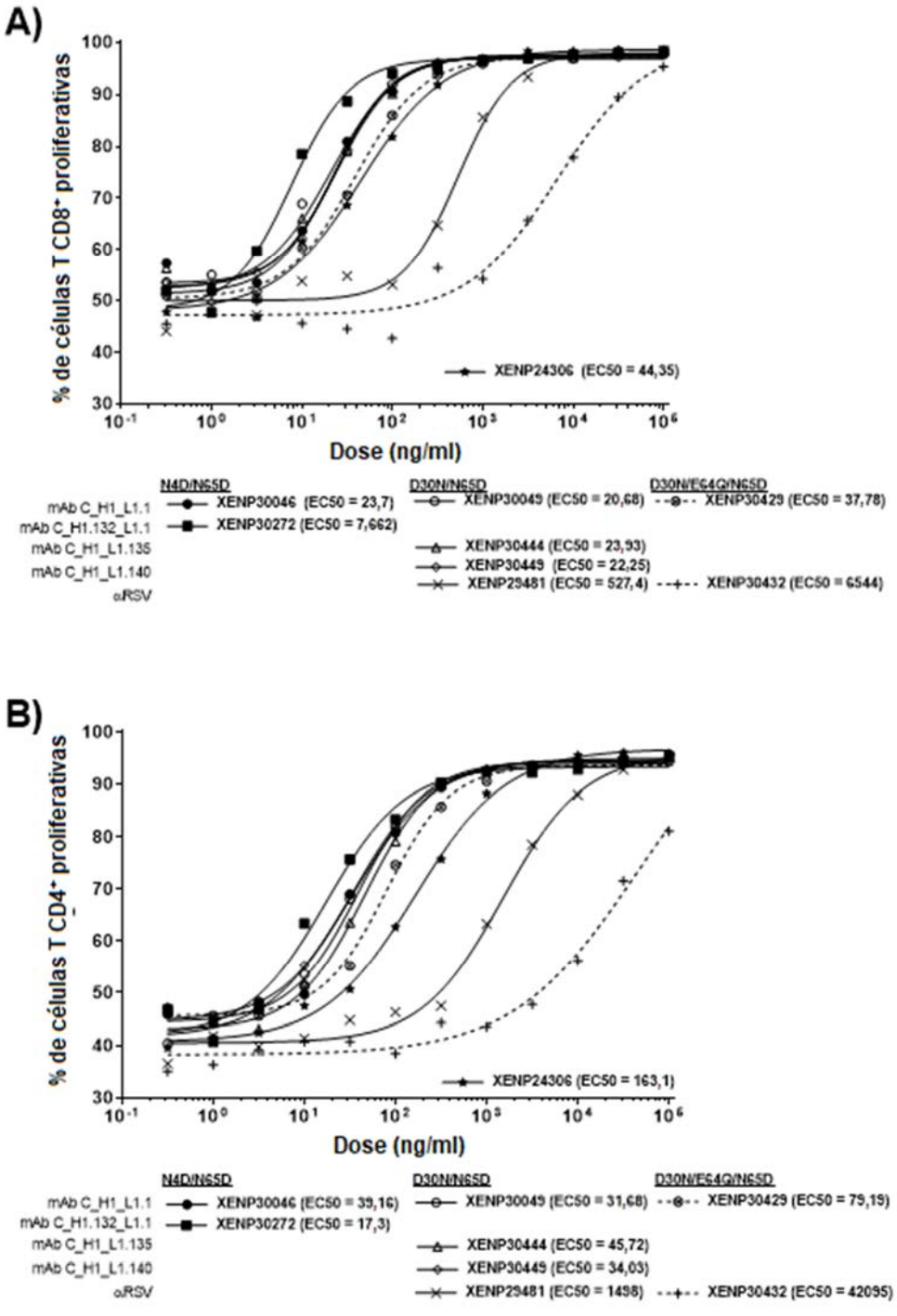

A)
% de células T CD8⁺ proliferativas
Dose (ng/ml)
XENP24306 (EC50 = 44,35)
N4D/N65D
D30N/N65D
D30N/E64Q/N65D
mAb C_H1_L1.1
mAb C_H1.132_L1.1
mAb C_H1_L1.135
mAb C_H1_L1.140
αRSV
XENP30046 (EC50 = 23,7)
XENP30272 (EC50 = 7,662)
XENP30049 (EC50 = 20,68)
XENP30429 (EC50 = 37,78)
XENP30444 (EC50 = 23,93)
XENP30449 (EC50 = 22,25)
XENP29481 (EC50 = 527,4)
XENP30432 (EC50 = 6544)
B)
% de células T CD4⁺ proliferativas
Dose (ng/ml)
XENP24306 (EC50 = 163,1)
N4D/N65D
D30N/N65D
D30N/E64Q/N65D
mAb C_H1_L1.1
mAb C_H1.132_L1.1
mAb C_H1_L1.135
mAb C_H1_L1.140
αRSV
XENP30046 (EC50 = 39,16)
XENP30272 (EC50 = 17,3)
XENP30049 (EC50 = 31,68)
XENP30429 (EC50 = 79,19)
XENP30444 (EC50 = 45,72)
XENP30449 (EC50 = 34,03)
XENP29481 (EC50 = 1498)
XENP30432 (EC50 = 42095)

Figura 81

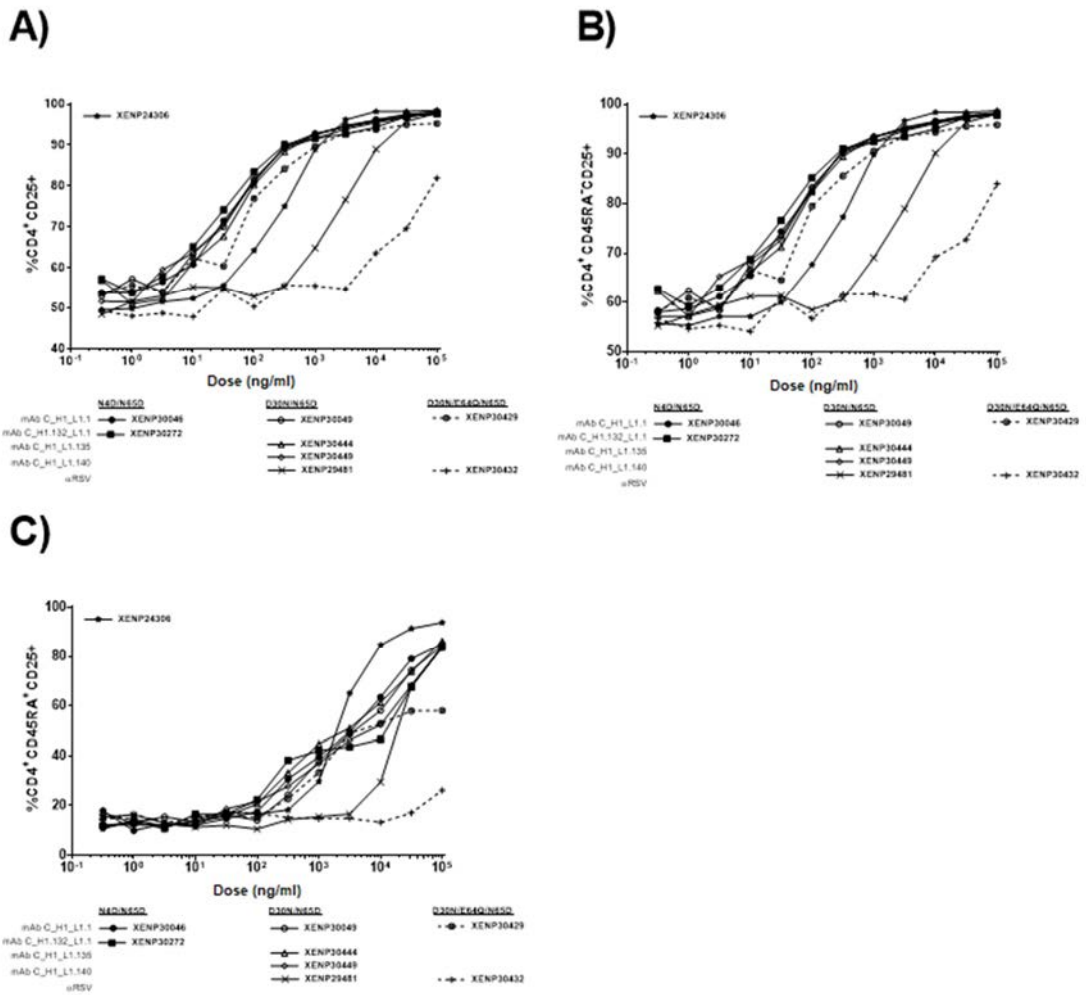

A)
B)
C)
XENP24306
%CD4+CD25+
%CD4+CD45RA-CD25+
Dose (ng/ml)
N4D/N65D
D30N/N65D
D30N/E64Q/N65D
mAb C_H1_L1.1
mAb C_H1.132_L1.1
mAb C_H1_L1.135
mAb C_H1_L1.140
αRSV
XENP30046
XENP30272
XENP30049
XENP30444
XENP30449
XENP29481
XENP30429
XENP30432

Figura 82

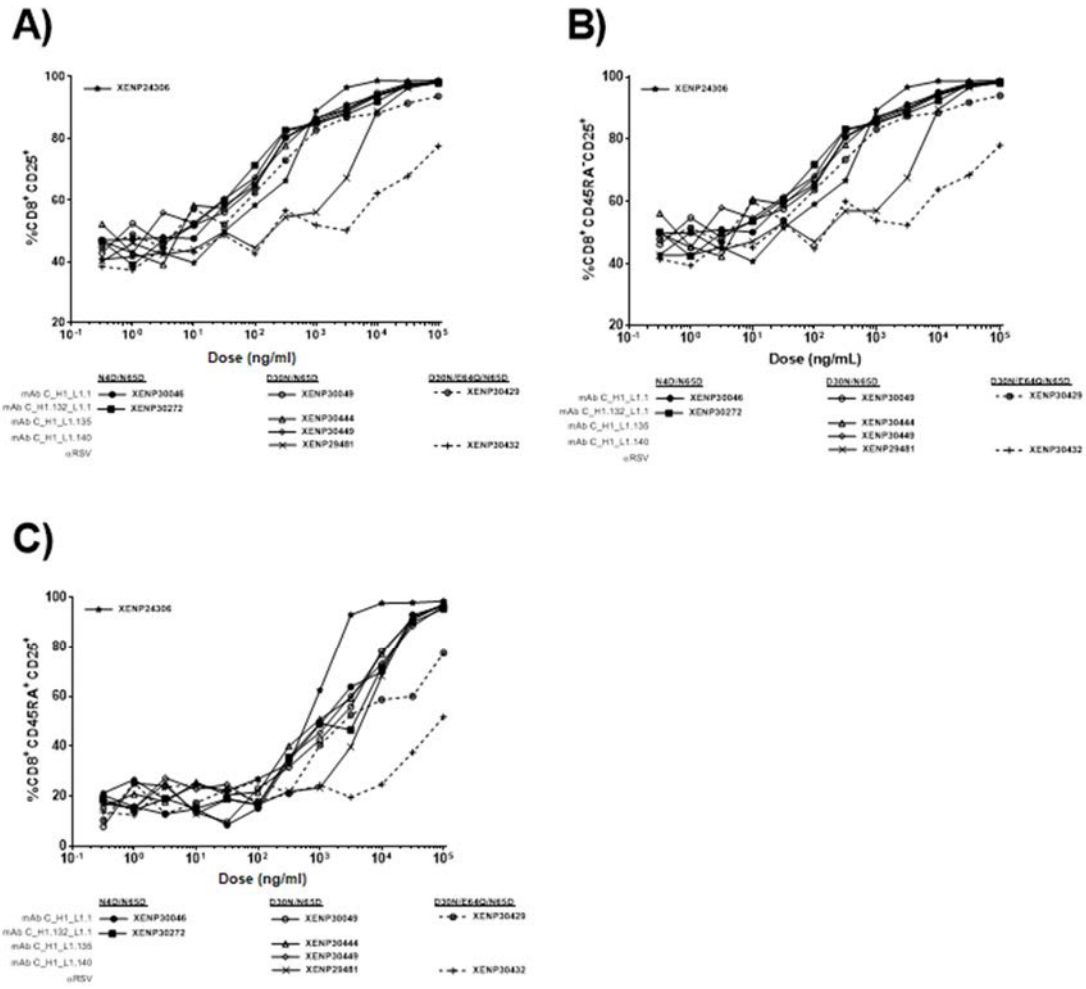

A)
B)
C)
XENP24306
%CD8+CD25+
%CD8+CD45RA+CD25+
Dose (ng/ml)
Dose (ng/mL)
N4D/N65D
D30N/N65D
D30N/E64Q/N65D
mAb C_H1_L1.1
mAb C_H1.132_L1.1
mAb C_H1_L1.135
mAb C_H1_L1.140
αRSV
XENP30046
XENP30272
XENP30049
XENP30444
XENP30449
XENP29481
XENP30429
XENP30432

Figura 83

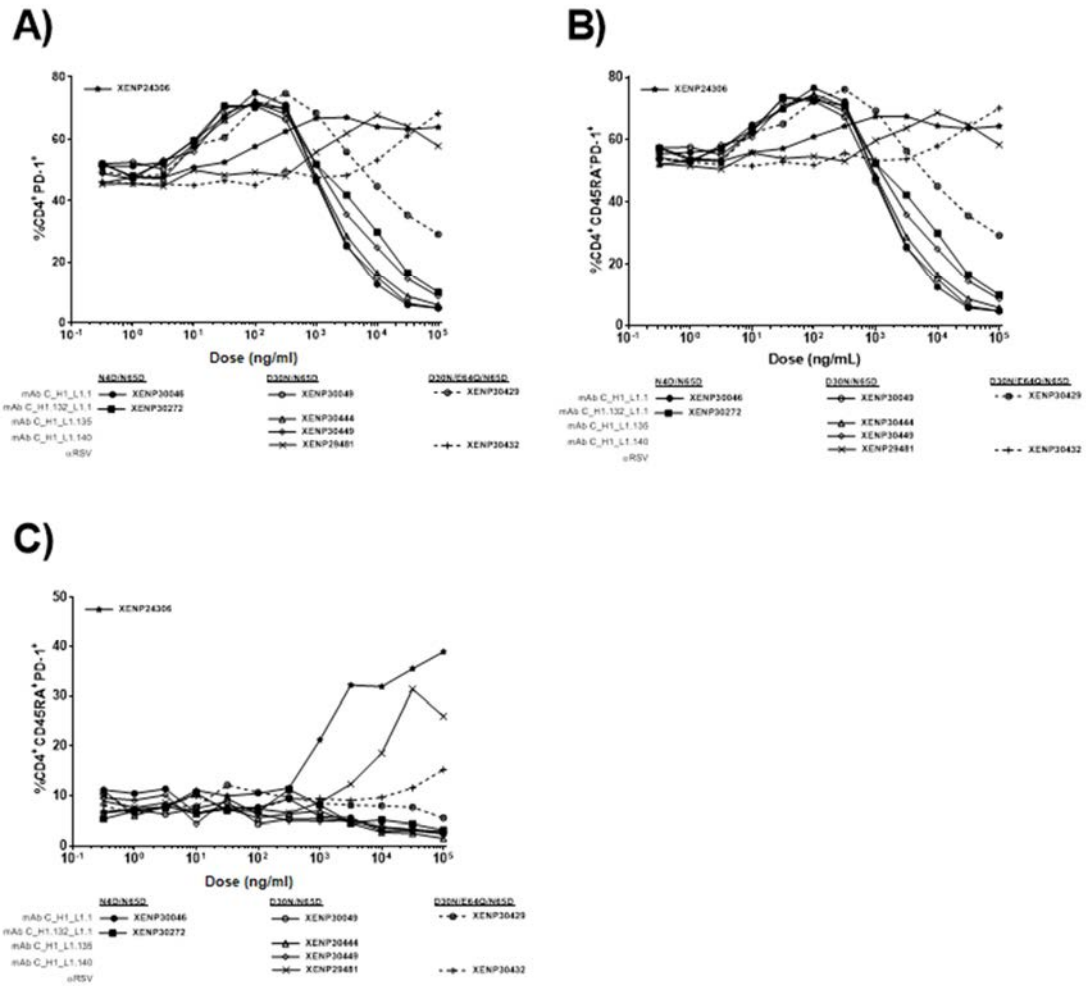

A)
B)
C)
XENP24306
%CD4+ PD-1+
%CD4+ CD45RA- PD-1+
%CD4+ CD45RA+ PD-1+
Dose (ng/ml)
Dose (ng/mL)
N4D/N65D
D30N/N65D
D30N/E64Q/N65D
mAb C_H1_L1.1
mAb C_H1.132_L1.1
mAb C_H1_L1.135
mAb C_H1_L1.140
αRSV
XENP30046
XENP30272
XENP30049
XENP30444
XENP30449
XENP29481
XENP30429
XENP30432

Figura 84

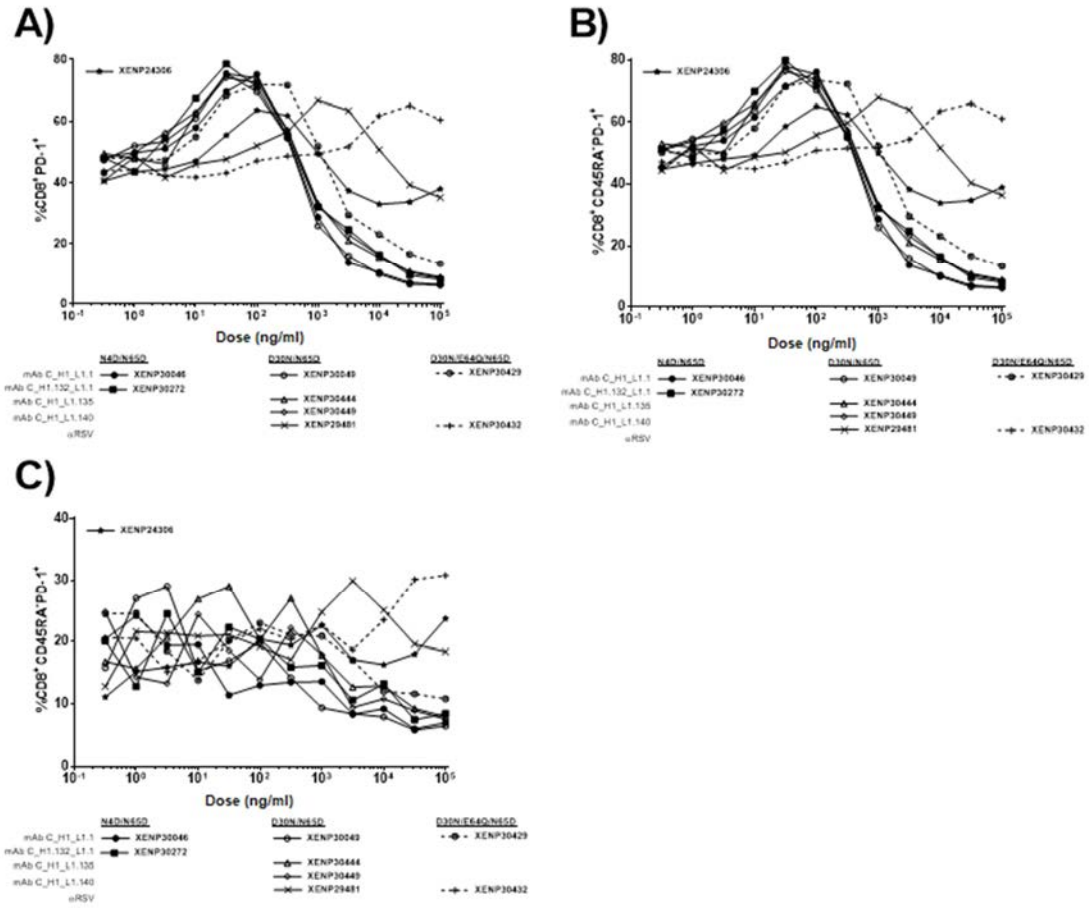

A)
B)
C)
XENP24306
%CD8+ PD-1+
%CD8+ CD45RA+PD-1+
Dose (ng/ml)
N6D/N65D
D30N/N65D
D30N/E64Q/N65D
mAb C_H1_L1.1
mAb C_H1.132_L1.1
mAb C_H1_L1.135
mAb C_H1_L1.140
αRSV
XENP30046
XENP30272
XENP30049
XENP30444
XENP30449
XENP29481
XENP30429
XENP30432

Figura 85

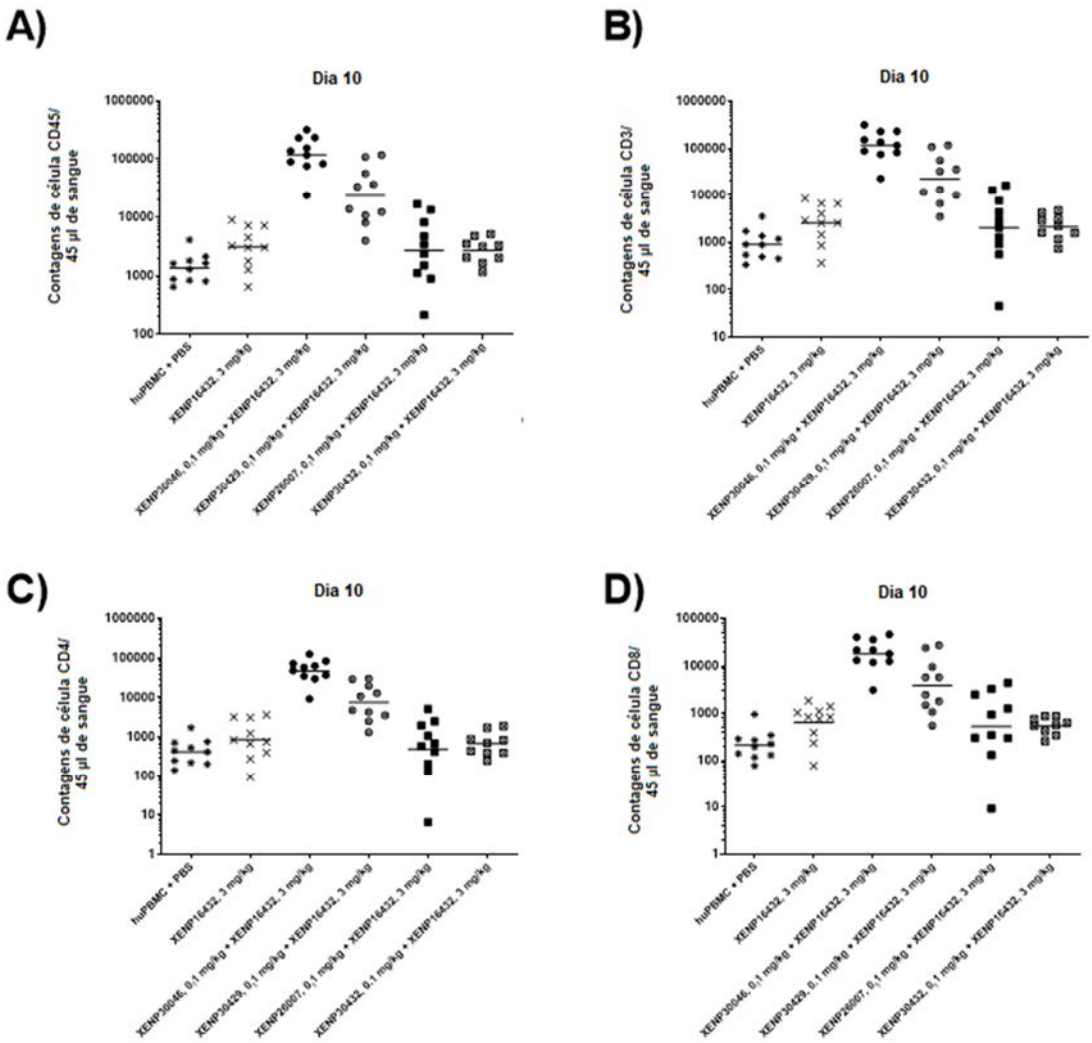

A)
Dia 10
Contagens de célula CD45/ 45 µl de sangue
1000000
100000
10000
1000
100
huPBMC + PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP30446, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30429, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP26007, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30432, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
B)
Dia 10
Contagens de célula CD3/ 45 µl de sangue
1000000
100000
10000
1000
100
10
huPBMC + PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP30446, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30429, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP26007, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30432, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
C)
Dia 10
Contagens de célula CD4/ 45 µl de sangue
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
huPBMC + PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP30446, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30429, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP26007, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30432, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
D)
Dia 10
Contagens de célula CD8/ 45 µl de sangue
100000
10000
1000
100
10
1
huPBMC + PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP30446, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30429, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP26007, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30432, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg

Figura 86

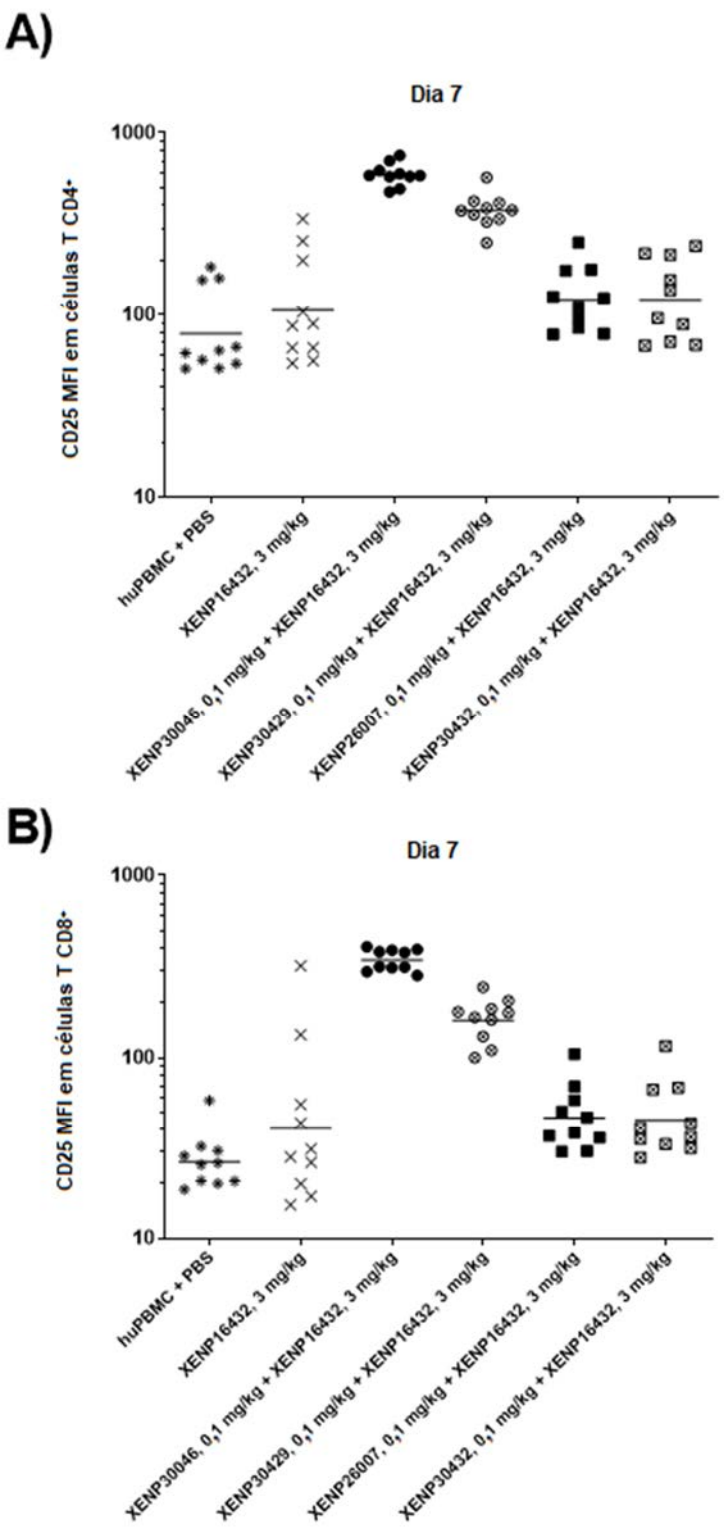
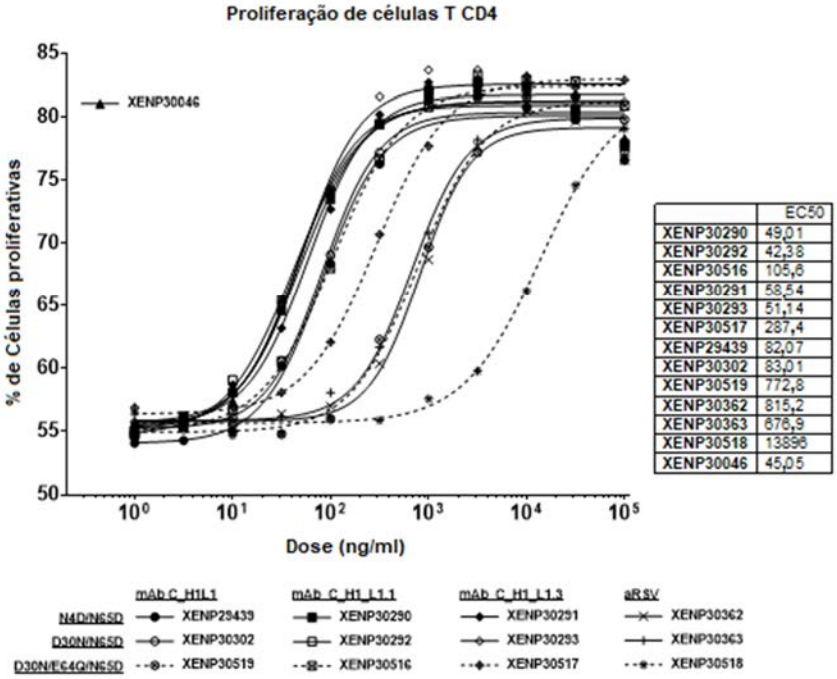
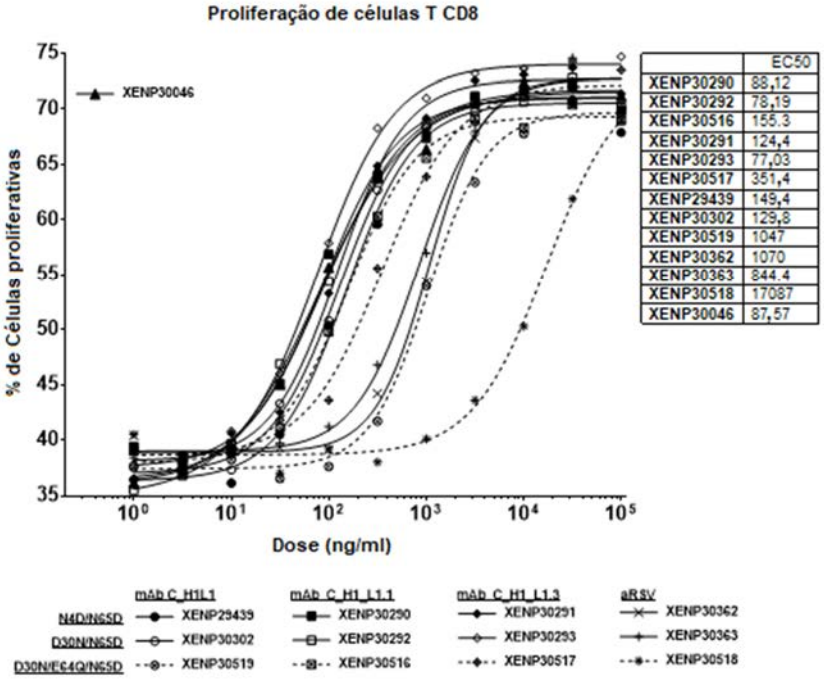

A)
Dia 7
CD25 MFI em células T CD4+
1000
100
10
huPBMC + PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP30046, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30429, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP26007, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30432, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
B)
Dia 7
CD25 MFI em células T CD8+
1000
100
10
huPBMC + PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP30046, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30429, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP26007, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30432, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg

Figura 87A



	EC50
XENP30290	49,01
XENP30292	42,38
XENP30516	105,6
XENP30291	58,54
XENP30293	51,14
XENP30517	287,4
XENP29439	82,07
XENP30302	83,01
XENP30519	772,8
XENP30362	815,2
XENP30363	676,9
XENP30518	13896
XENP30046	45,05

Figura 87B



	EC50
XENP30290	88,12
XENP30292	78,19
XENP30516	155,3
XENP30291	124,4
XENP30293	77,03
XENP30517	351,4
XENP29439	149,4
XENP30302	129,8
XENP30519	1047
XENP30362	1070
XENP30363	844.4
XENP30518	17087
XENP30046	87,57

Figura 87C

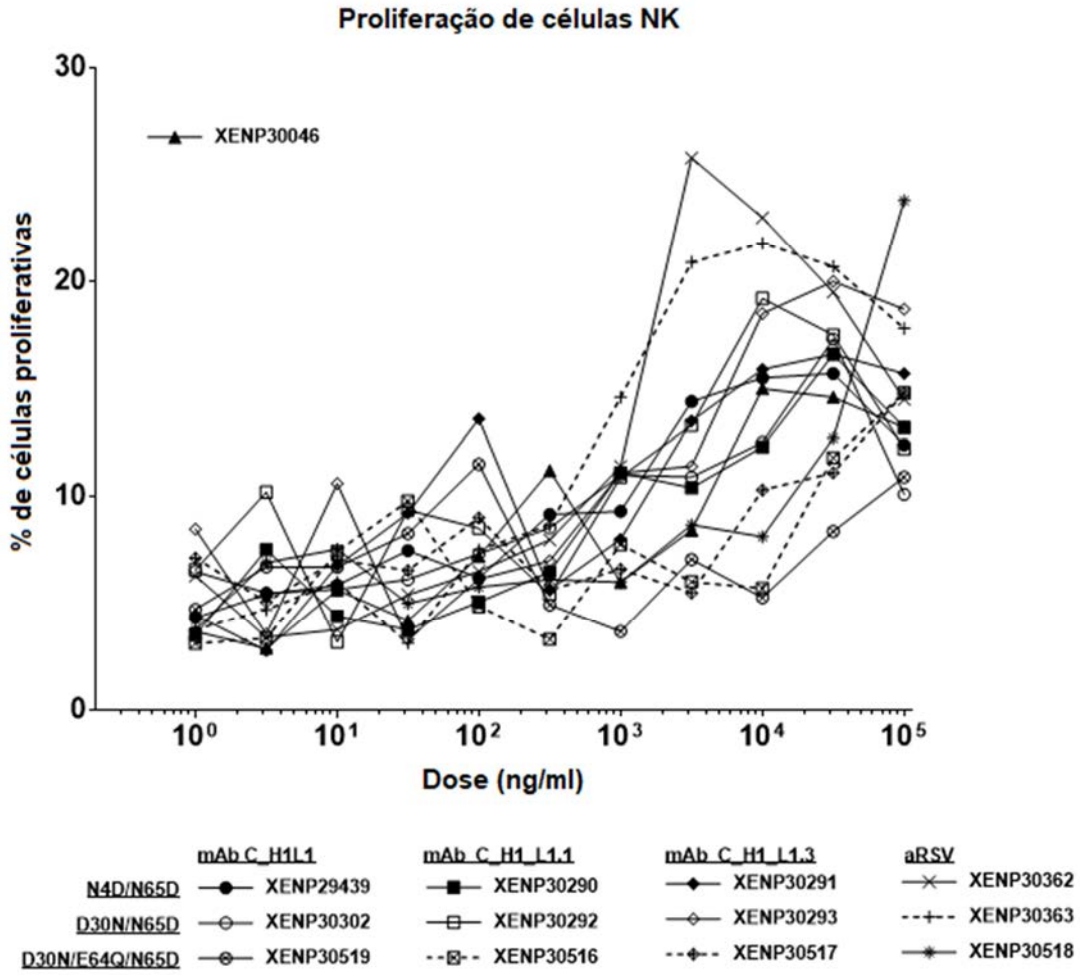

Proliferação de células NK
% de células proliferativas
Dose (ng/ml)
XENP30046
mAb C_H1L1
mAb C_H1_L1.1
mAb C_H1_L1.3
aRSV
N4D/N65D
D30N/N65D
D30N/E64Q/N65D
XENP29439
XENP30302
XENP30519
XENP30290
XENP30292
XENP30516
XENP30291
XENP30293
XENP30517
XENP30362
XENP30363
XENP30518

Figura 88

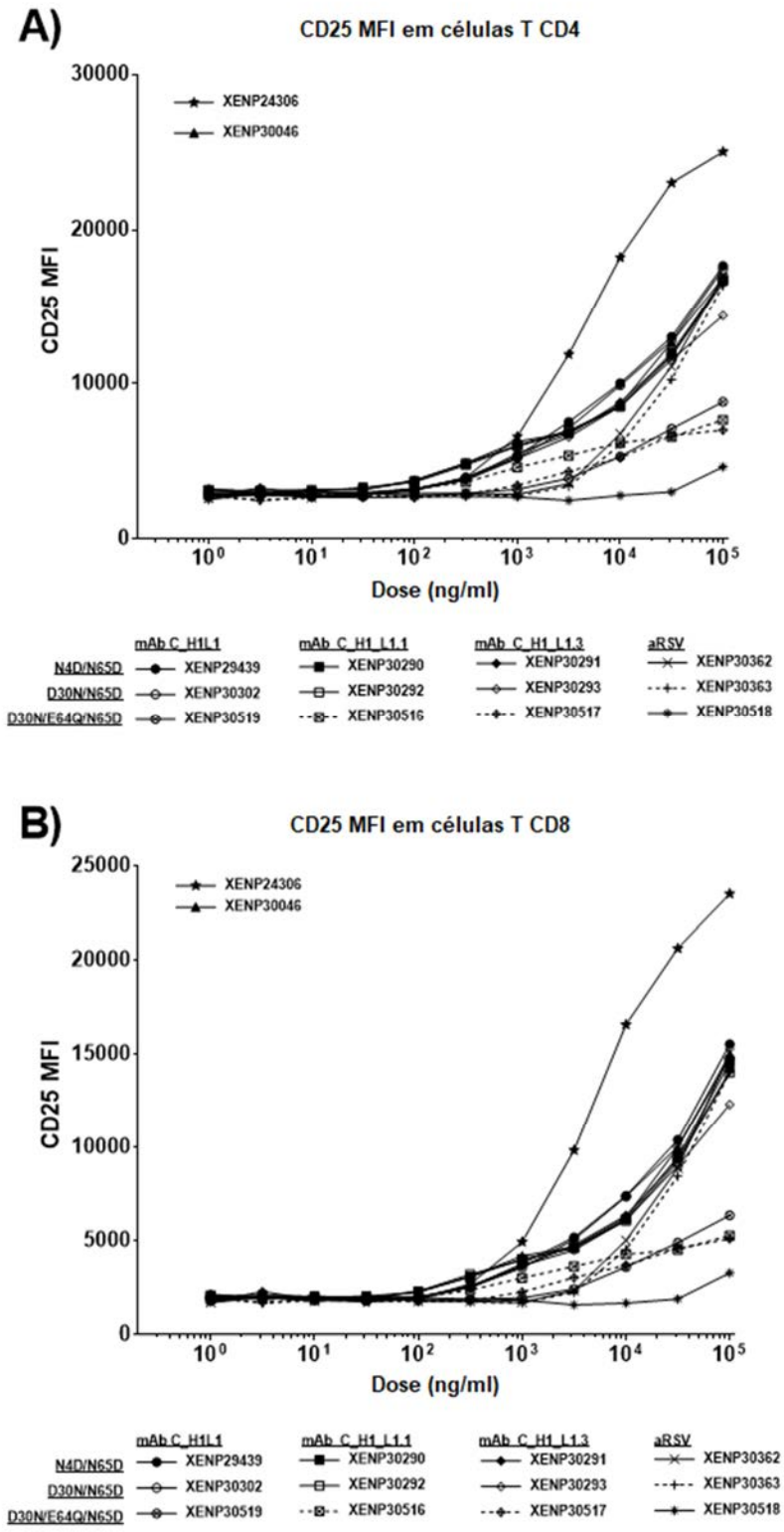
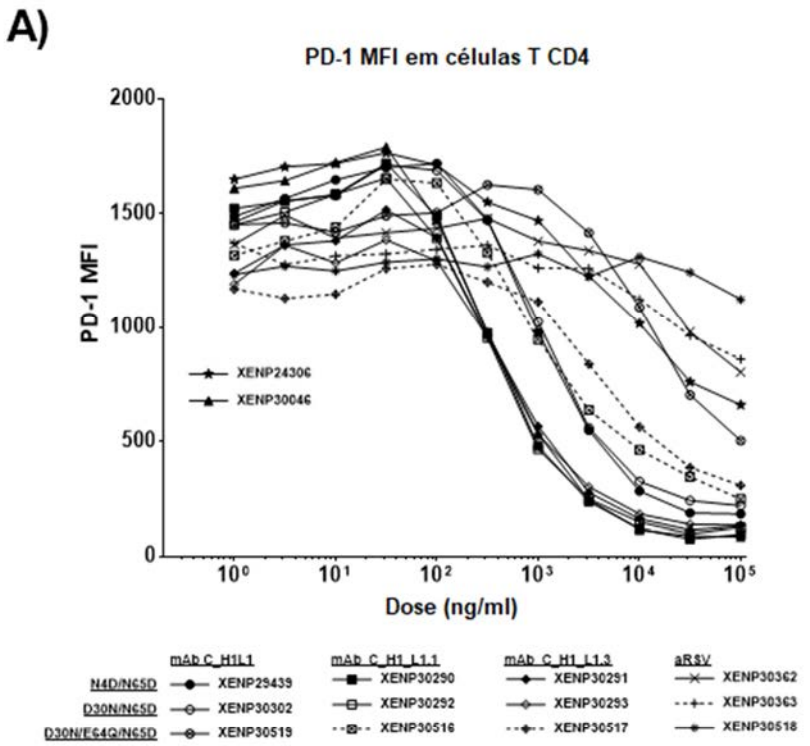

A)
CD25 MFI em células T CD4
CD25 MFI
Dose (ng/ml)
XENP24306
XENP30046
B)
CD25 MFI em células T CD8
CD25 MFI
Dose (ng/ml)
XENP24306
XENP30046
mAb C_H1L1
mAb C_H1_L1.1
mAb C_H1_L1.3
aRSV
N4D/N65D
D30N/N65D
D30N/E64Q/N65D
XENP29439
XENP30302
XENP30519
XENP30290
XENP30292
XENP30516
XENP30291
XENP30293
XENP30517
XENP30362
XENP30363
XENP30518

Figura 89


A)
PD-1 MFI em células T CD4
PD-1 MFI
Dose (ng/ml)
XENP24306
XENP30046
mAb C_H1L1
mAb C_H1_L1.1
mAb C_H1_L1.3
aRSV
N4D/N65D
D30N/N65D
D30N/E64Q/N65D
XENP29439
XENP30302
XENP30519
XENP30290
XENP30292
XENP30516
XENP30291
XENP30293
XENP30517
XENP30362
XENP30363
XENP30518

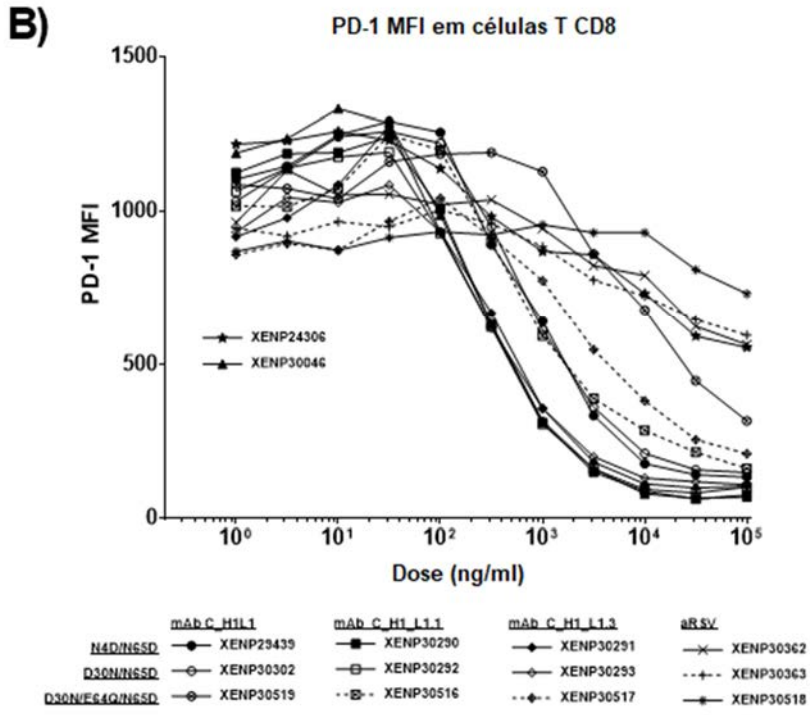
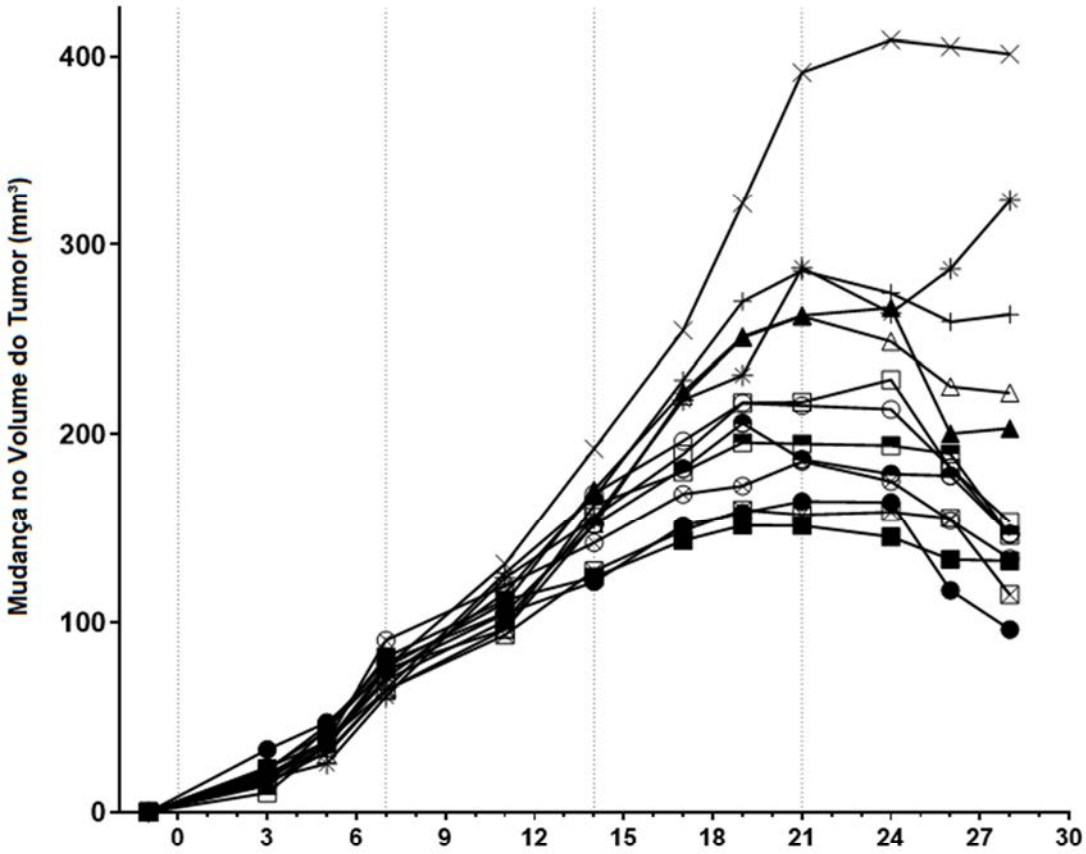

B)
PD-1 MFI em células T CD8
PD-1 MFI
Dose (ng/ml)
XENP24306
XENP30046
mAb C_H1L1
mAb C_H1_L1.1
mAb C_H1_L1.3
aRSV
N4D/N65D
D30N/N65D
D30N/E64Q/N65D
XENP29439
XENP30302
XENP30519
XENP30290
XENP30292
XENP30516
XENP30291
XENP30293
XENP30517
XENP30362
XENP30363
XENP30518

Figura 90



XENP30290 (mAb C_H1_L1.1; IL-15[N4D/N65D])

- XENP30290, 1 mg/kg
- XENP30290, 0,1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
- XENP30290, 0,3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
- XENP30290, 1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg

XENP30516 (mAb C_H1_L1.1; IL-15[D30N/E64Q/N65D])

- XENP30516, 3 mg/kg
- XENP30516, 0,3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
- XENP30516, 1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
- XENP30516, 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg

Controles

- huPBMC + PBS
- XENP31123 (αPD1 monovalente - mAb C_H1_L1.1), 0,25 mg/kg
- XENP16432 (αPD1 bivalente), 3 mg/kg
- XENP30362 (αRSV; IL-15[N4D/N65D]), 1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
- XENP30518 (αRSV; IL-15[D30N/E64Q/N65D]), 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg

Figura 91A-91D

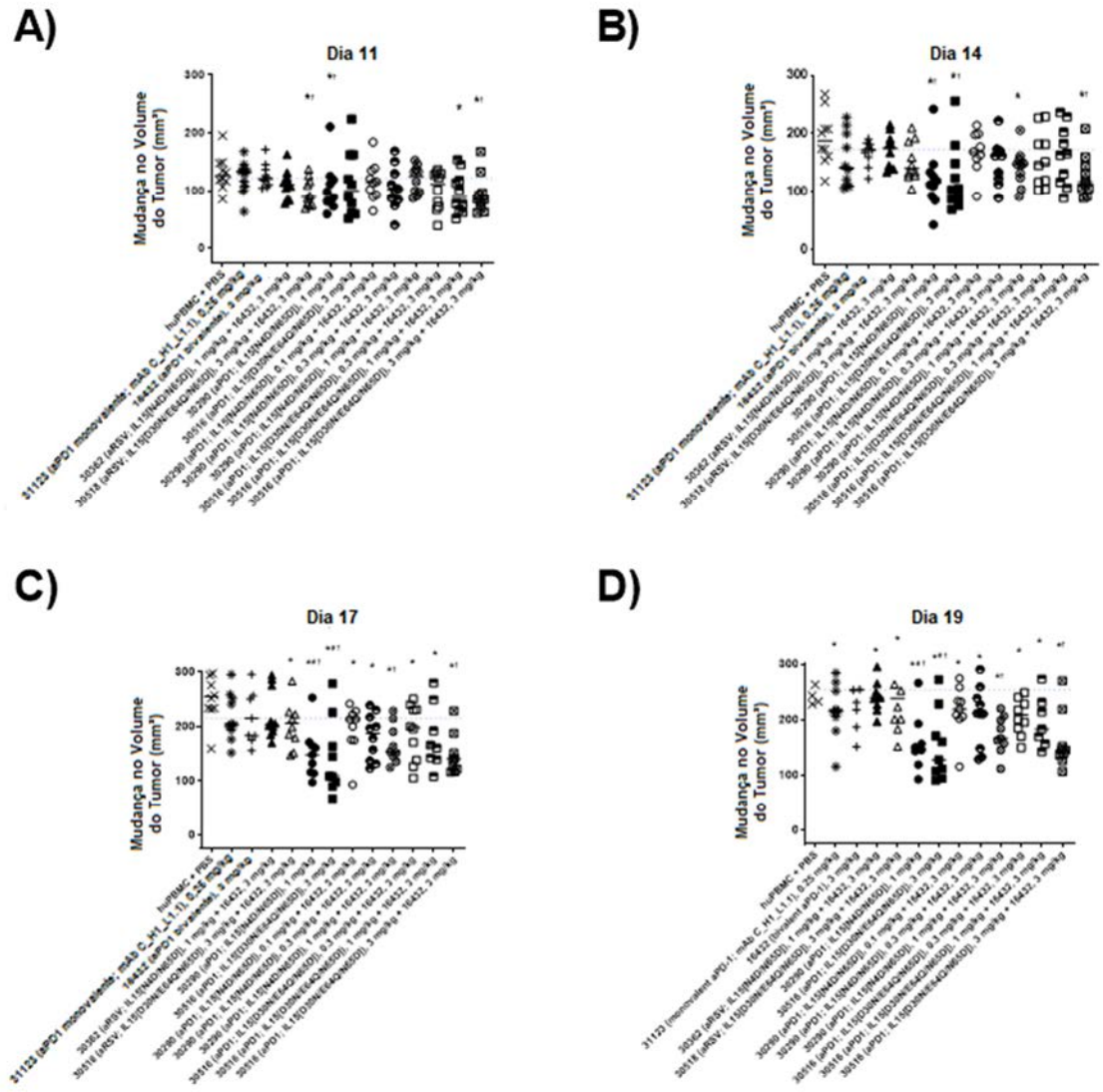


Figura 91E-91H

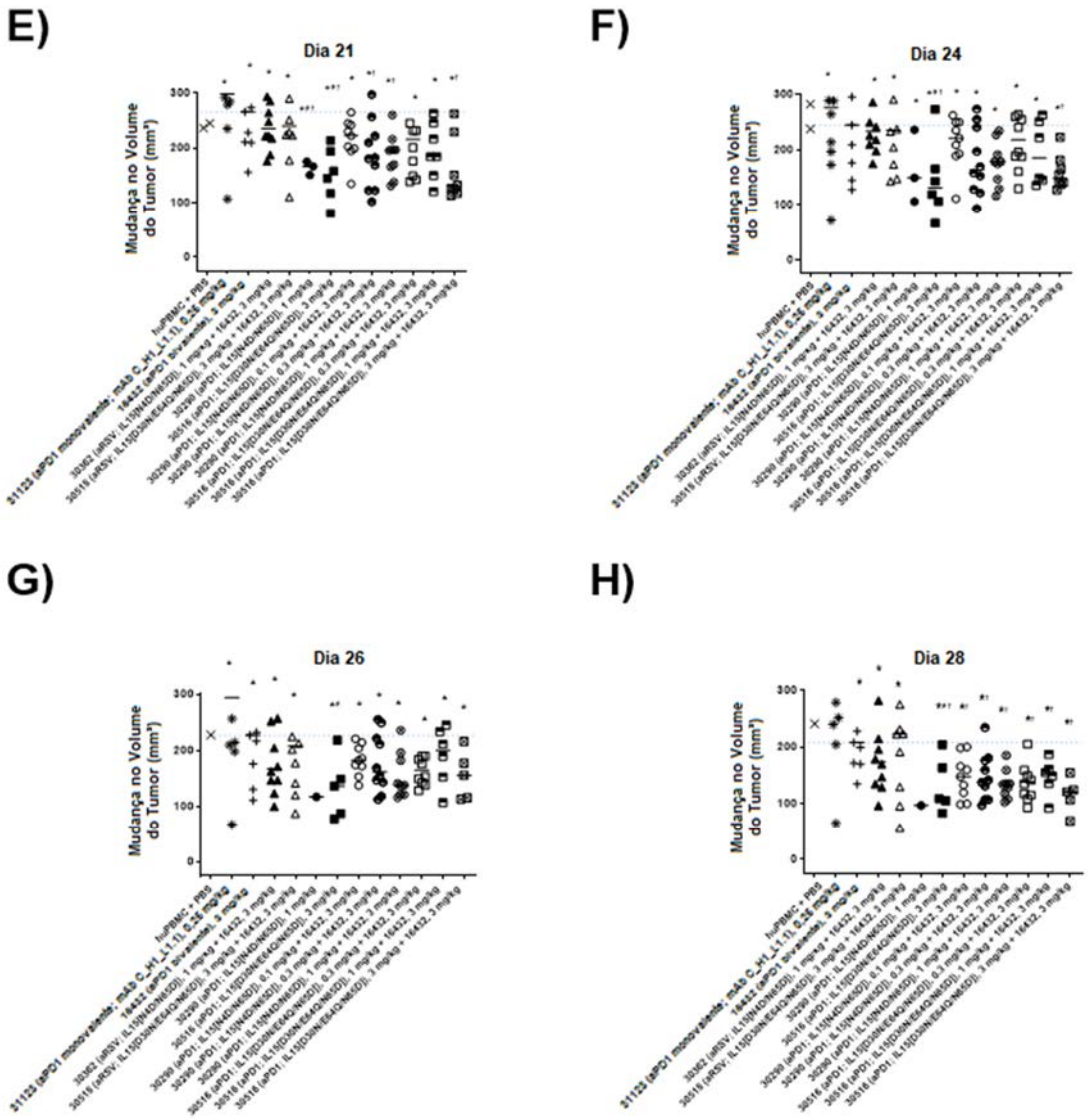


Figura 92A-92C

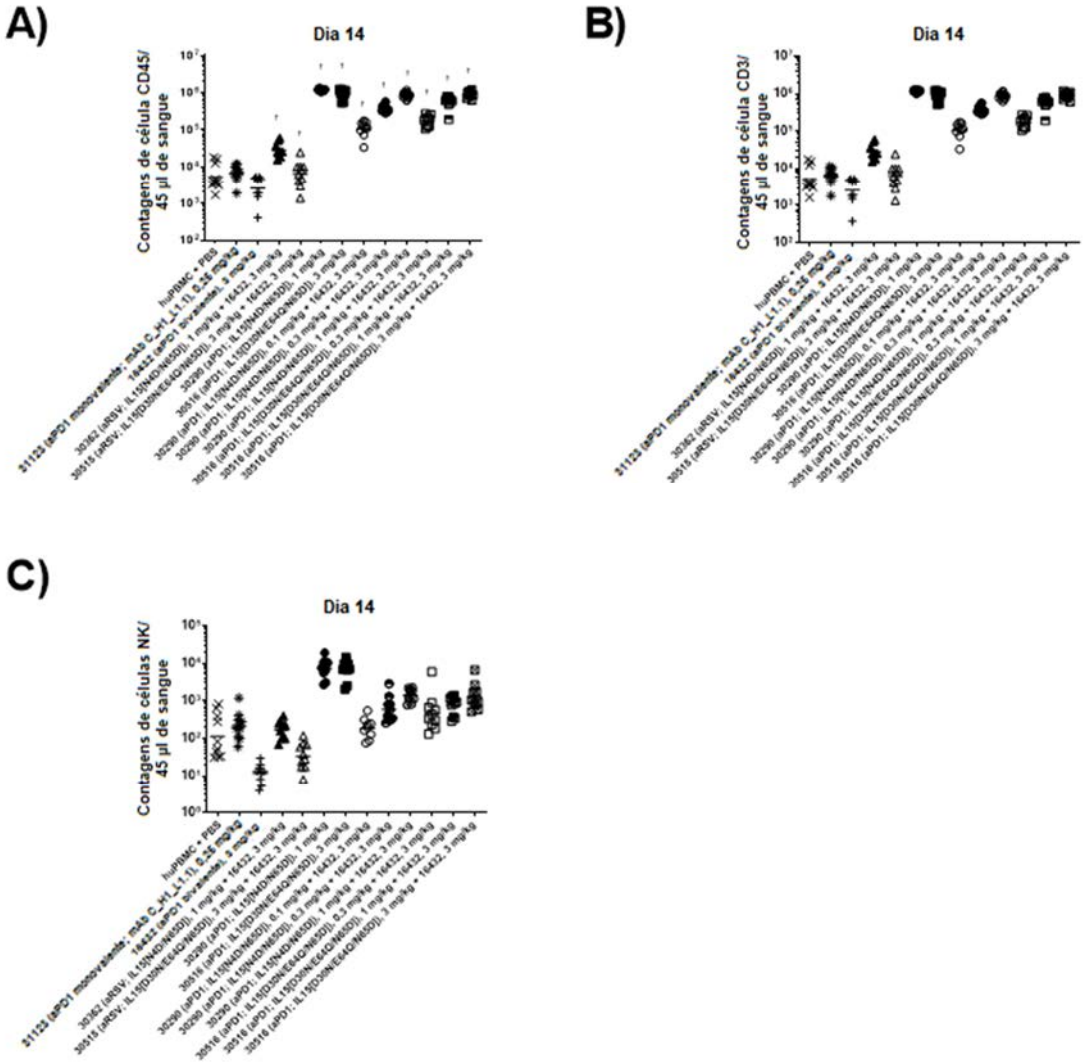


Figura 92D-92F

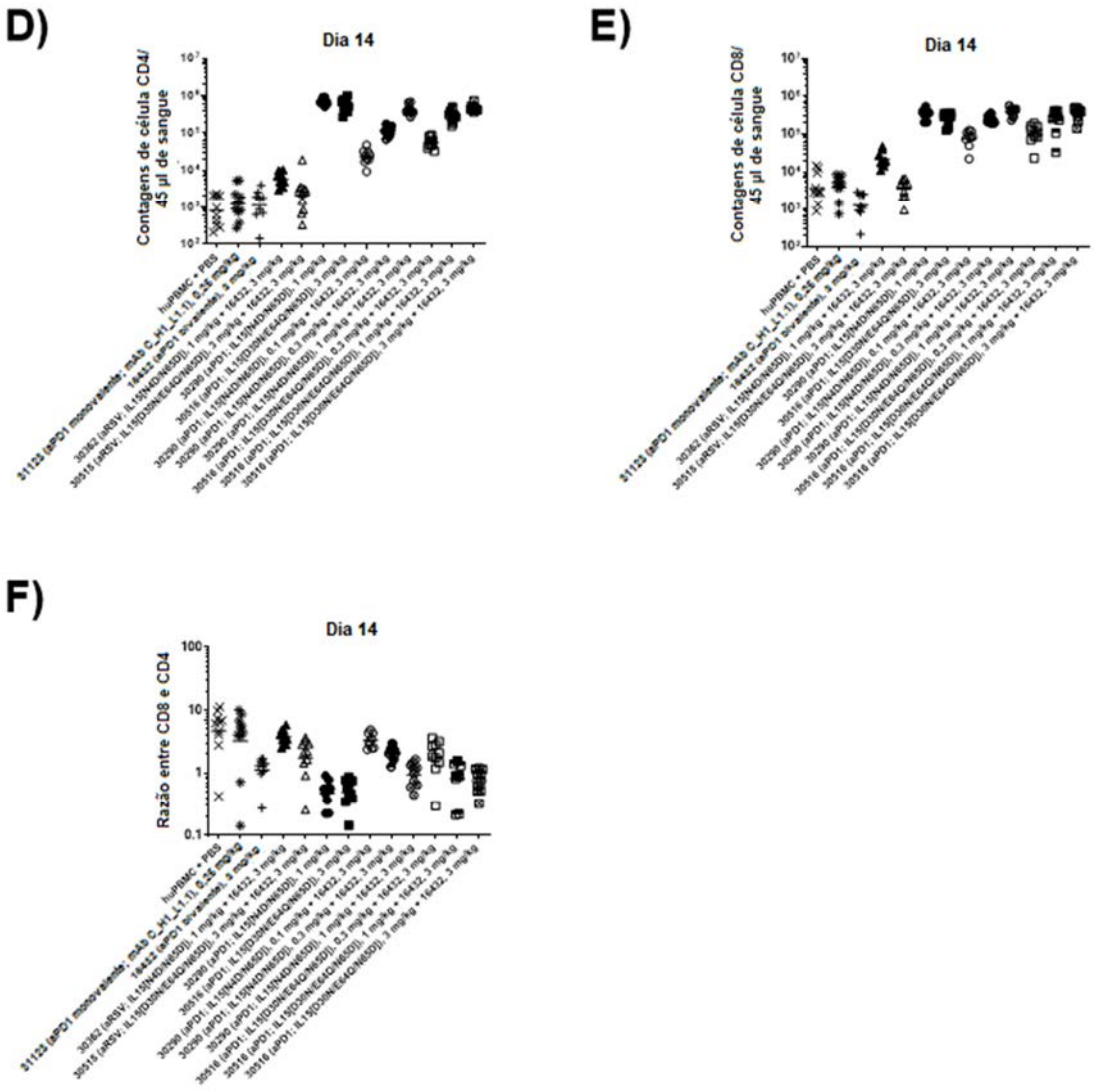


Figura 93A-93C

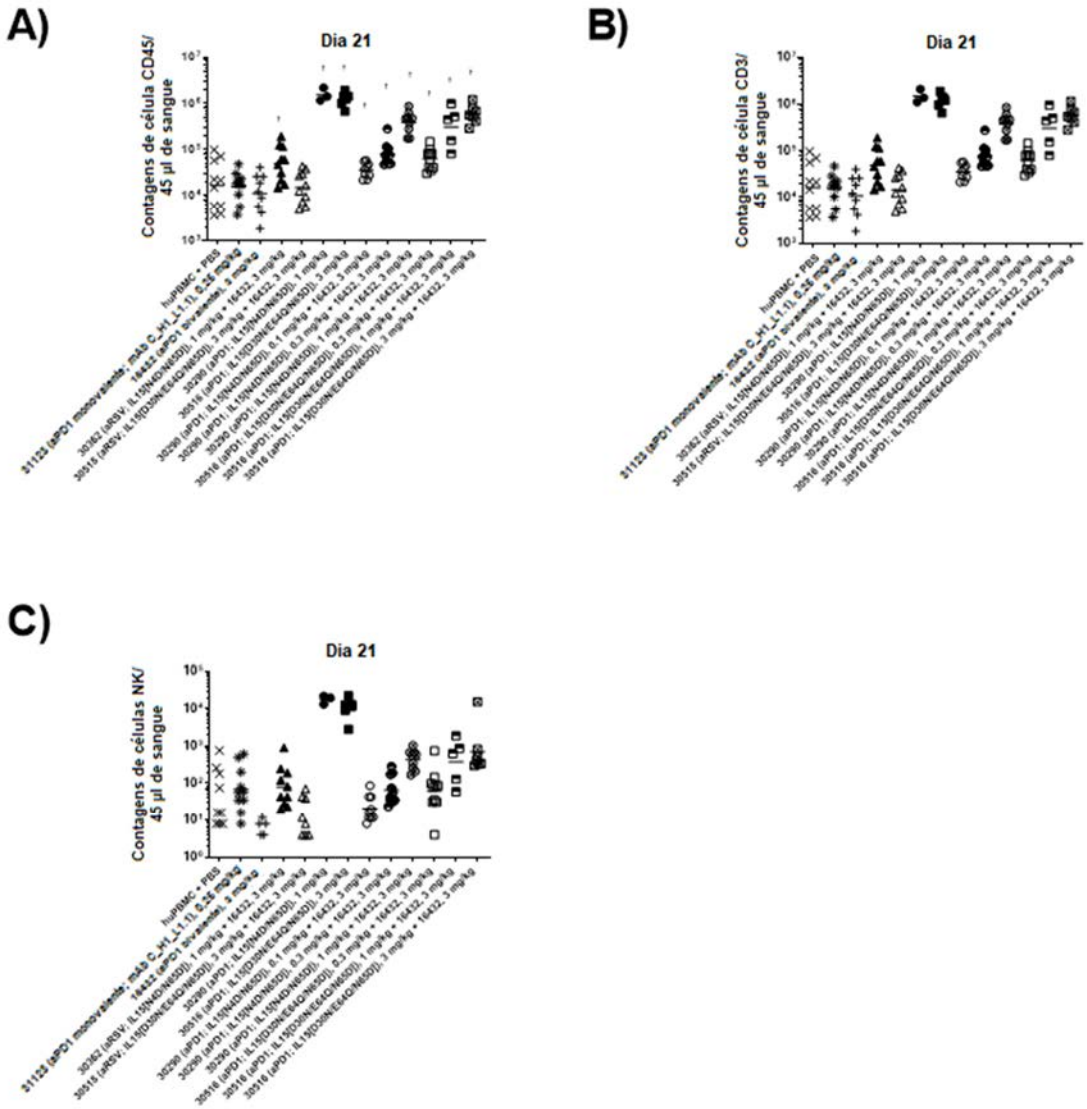
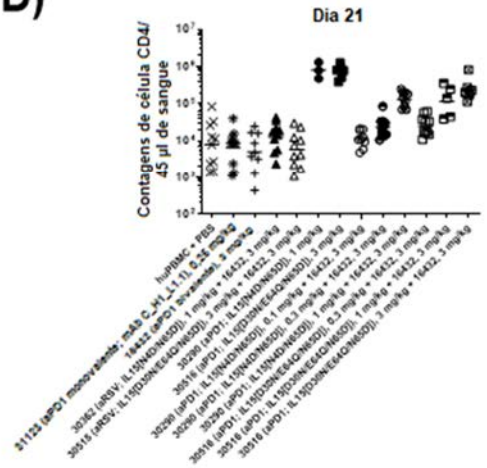
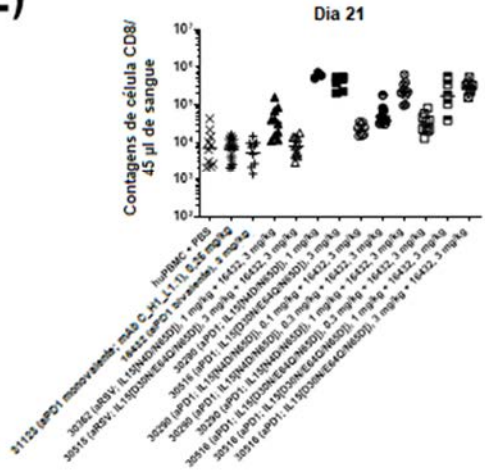


Figura 93D-93F

D)



E)



F)

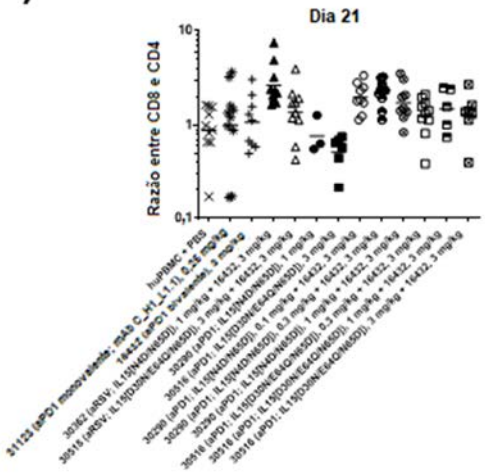


Figura 94

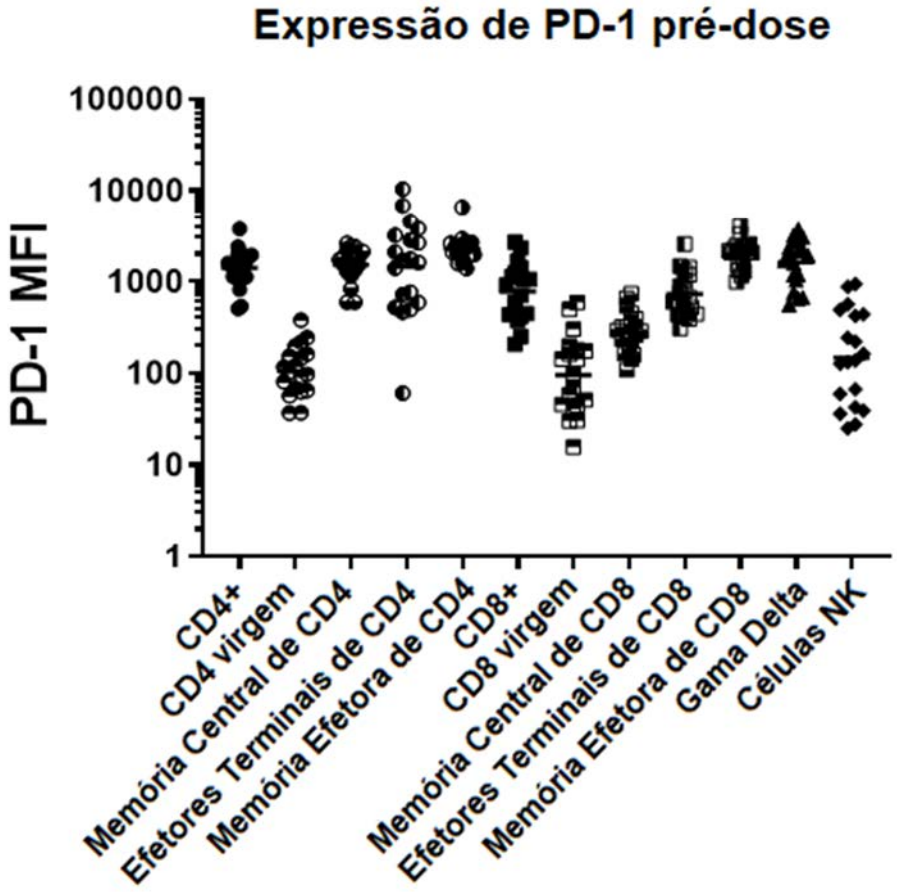

Expressão de PD-1 pré-dose
PD-1 MFI
100000
10000
1000
100
10
1
CD4+
CD4 virgem
Memória Central de CD4
Efetores Terminais de CD4
Memória Efetora de CD4
CD8+
CD8 virgem
Memória Central de CD8
Efetores Terminais de CD8
Memória Efetora de CD8
Gama Delta
Células NK

Figura 95

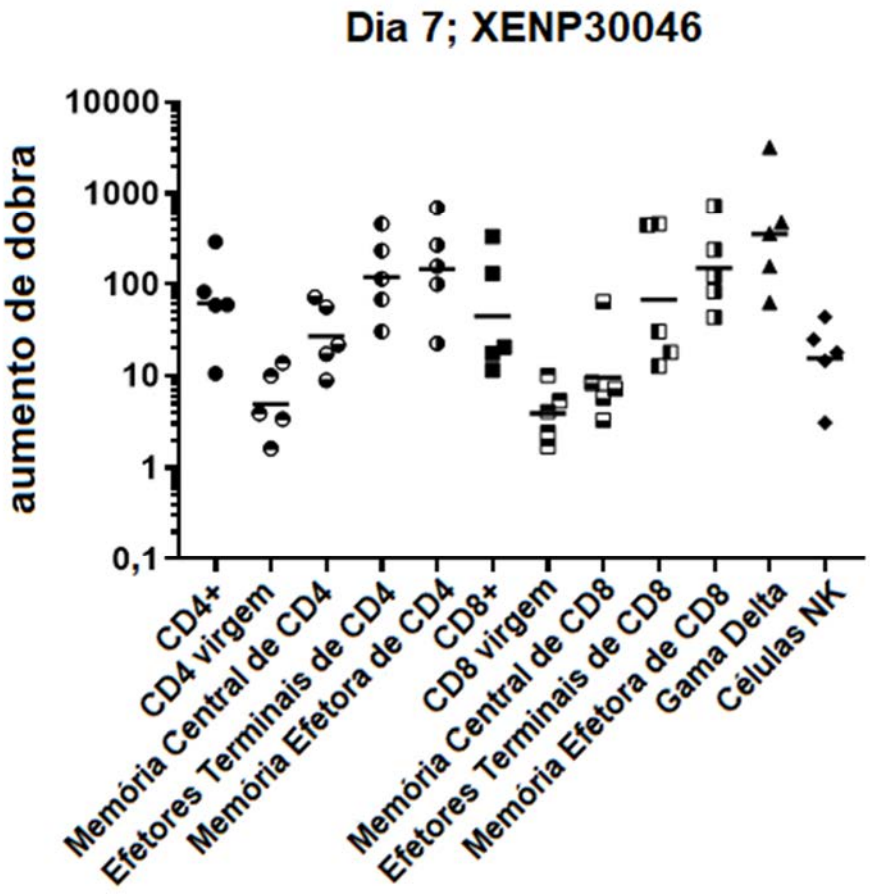

Dia 7; XENP30046
aumento de dobra
10000
1000
100
10
1
0,1
CD4+
CD4 virgem
Memória Central de CD4
Efetores Terminais de CD4
Memória Efetora de CD4
CD8+
CD8 virgem
Memória Central de CD8
Efetores Terminais de CD8
Memória Efetora de CD8
Gama Delta
Células NK

Figura 96

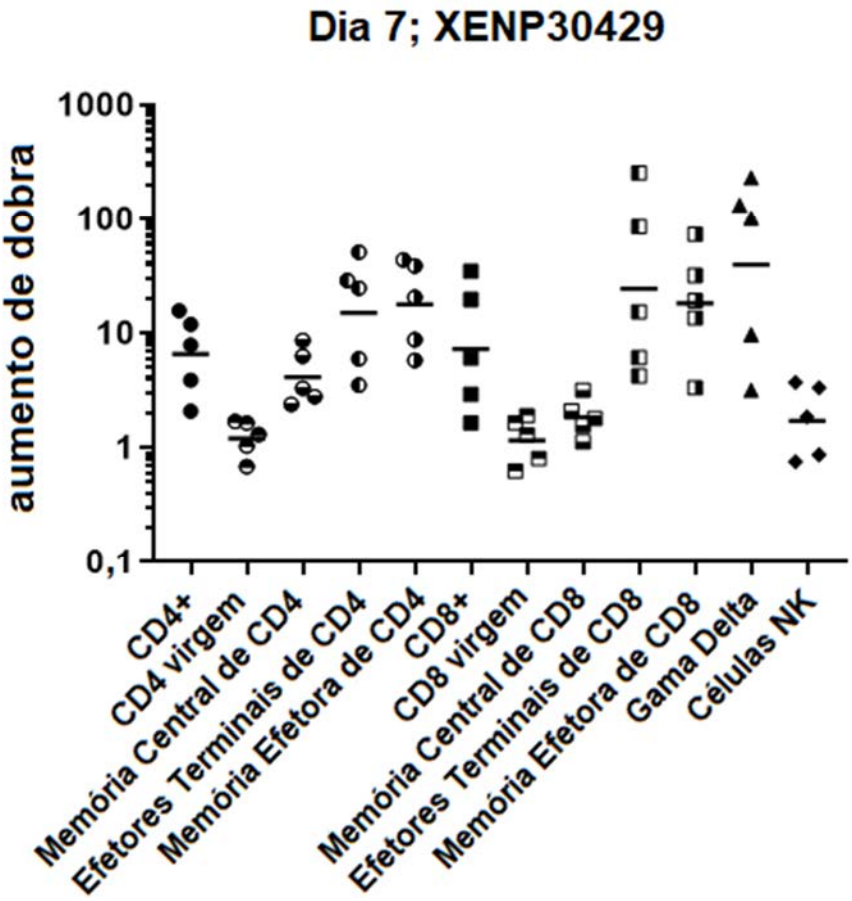

Dia 7; XENP30429
aumento de dobra
1000
100
10
1
0,1
CD4+
CD4 virgem
Memória Central de CD4
Efetores Terminais de CD4
Memória Efetora de CD4
CD8+
CD8 virgem
Memória Central de CD8
Efetores Terminais de CD8
Memória Efetora de CD8
Gama Delta
Células NK

Figura 97

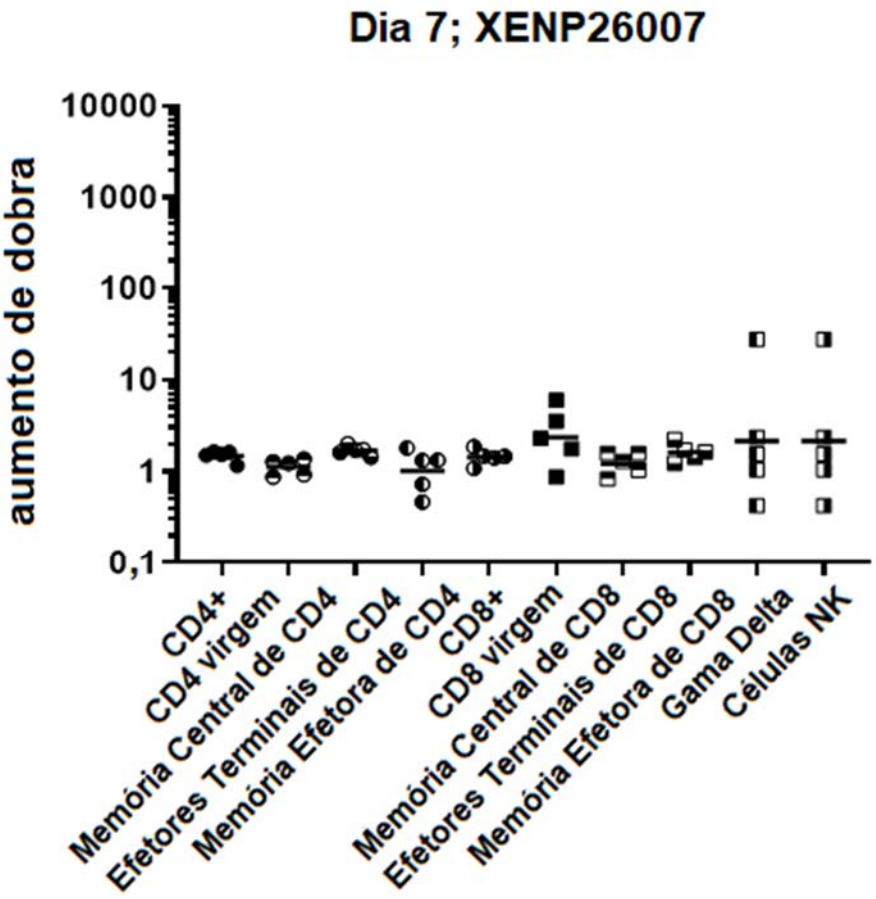

Dia 7; XENP26007
aumento de dobra
10000
1000
100
10
1
0,1
CD4+
CD4 virgem
Memória Central de CD4
Efetores Terminais de CD4
Memória Efetora de CD4
CD8+
CD8 virgem
Memória Central de CD8
Efetores Terminais de CD8
Memória Efetora de CD8
Gama Delta
Células NK

Figura 98

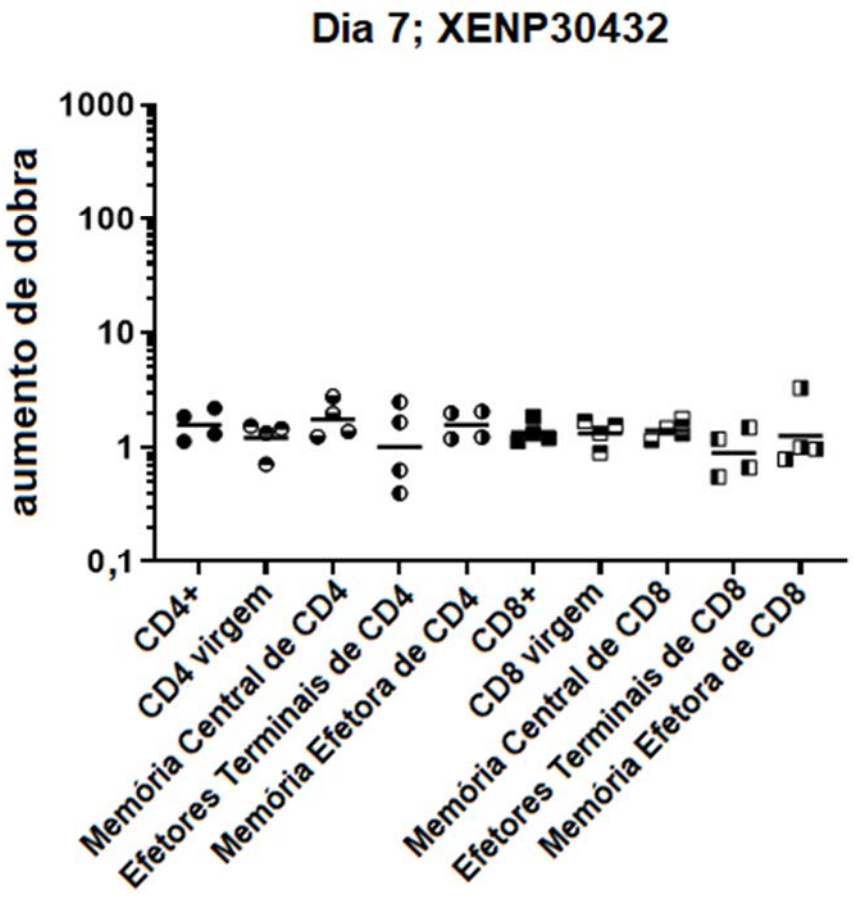

Dia 7; XENP30432
aumento de dobra
1000
100
10
1
0,1
CD4+
CD4 virgem
Memória Central de CD4
Efetores Terminais de CD4
Memória Efetora de CD4
CD8+
CD8 virgem
Memória Central de CD8
Efetores Terminais de CD8
Memória Efetora de CD8

Figura 99

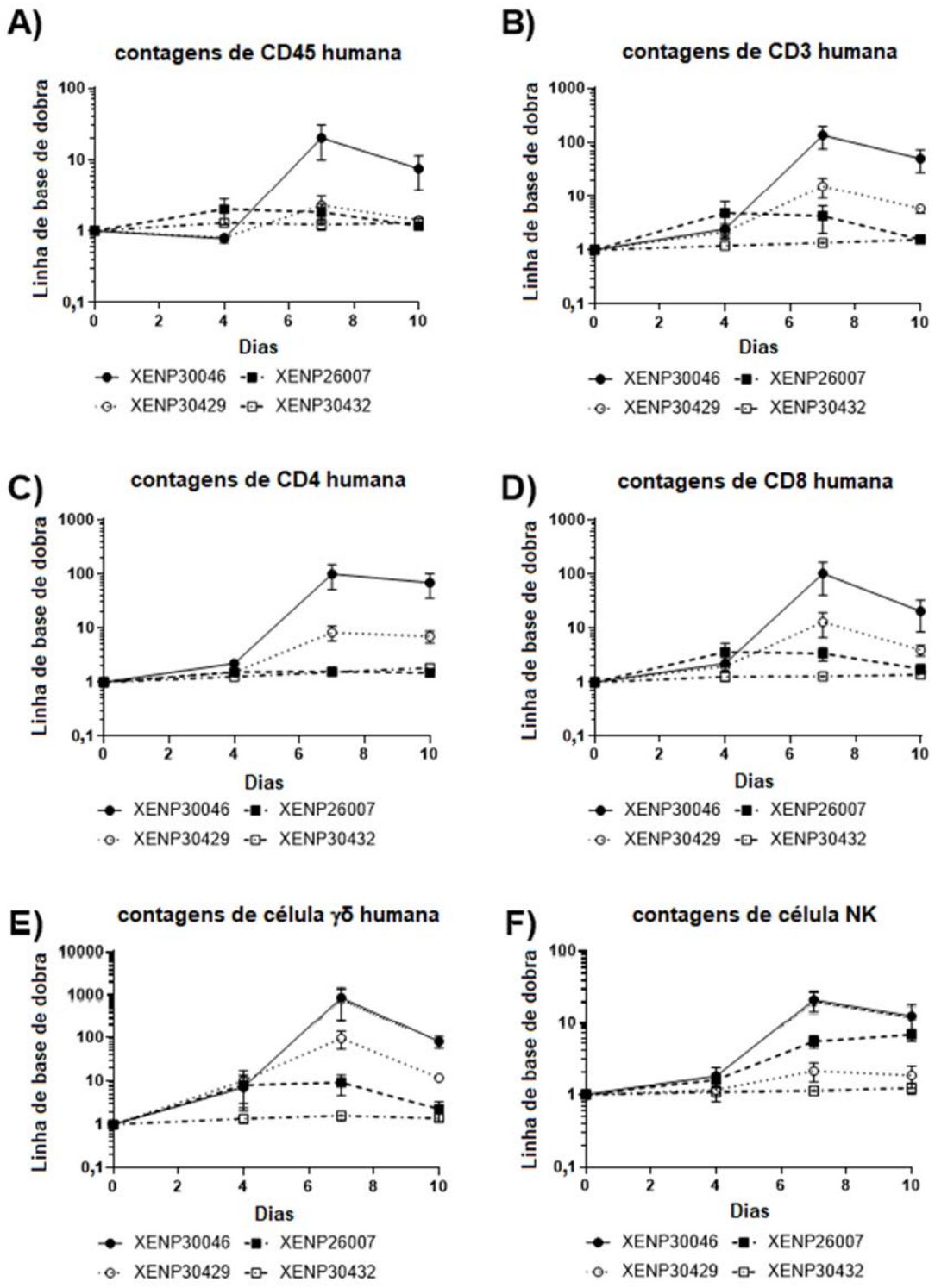

A)
contagens de CD45 humana
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
B)
contagens de CD3 humana
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
C)
contagens de CD4 humana
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
D)
contagens de CD8 humana
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
E)
contagens de célula γδ humana
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
F)
contagens de célula NK
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432

Figura 100

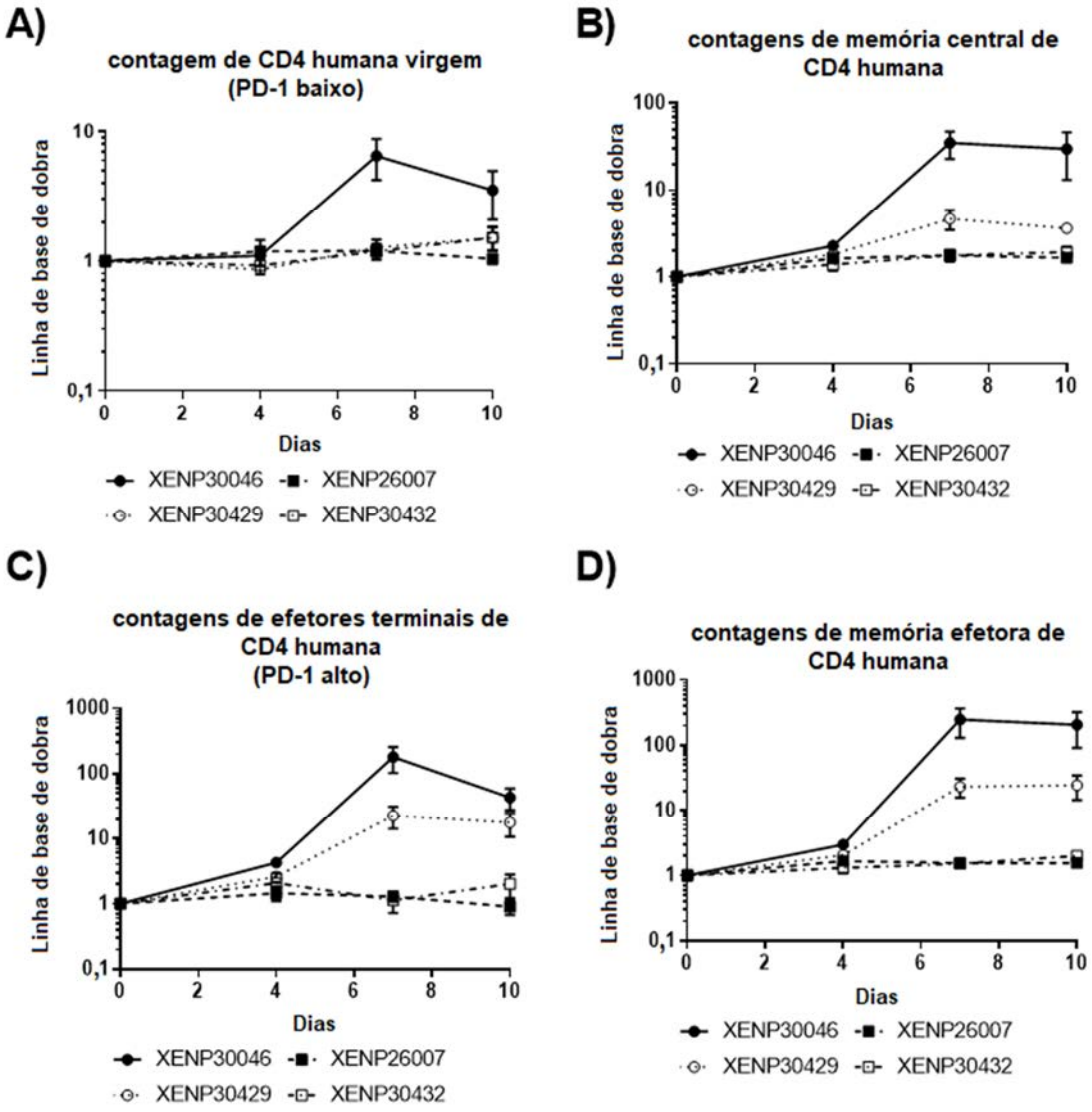

A)
contagem de CD4 humana virgem (PD-1 baixo)
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
B)
contagens de memória central de CD4 humana
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
C)
contagens de efetores terminais de CD4 humana (PD-1 alto)
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
D)
contagens de memória efetora de CD4 humana
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432

Figura 101

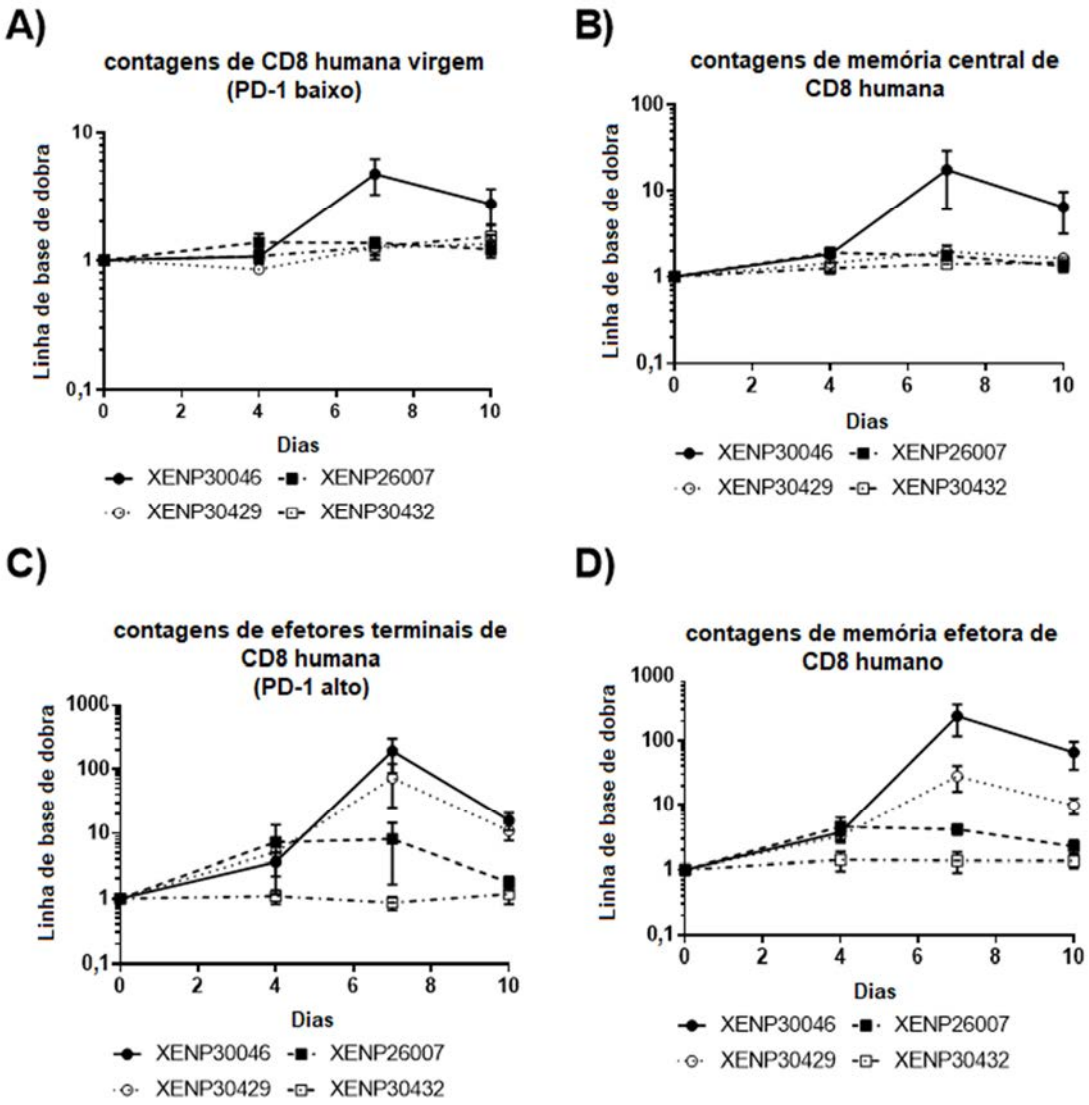

A)
contagens de CD8 humana virgem (PD-1 baixo)
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
B)
contagens de memória central de CD8 humana
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
C)
contagens de efetores terminais de CD8 humana (PD-1 alto)
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432
D)
contagens de memória efetora de CD8 humano
Linha de base de dobra
Dias
XENP30046
XENP26007
XENP30429
XENP30432

Figura 102A

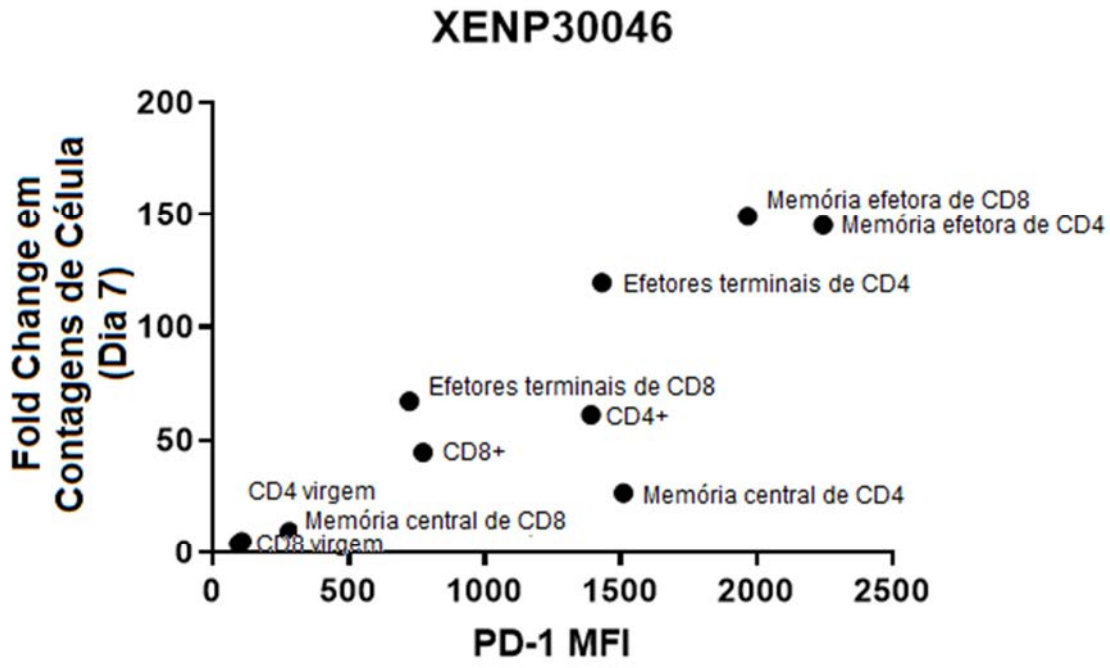


Figura 102B

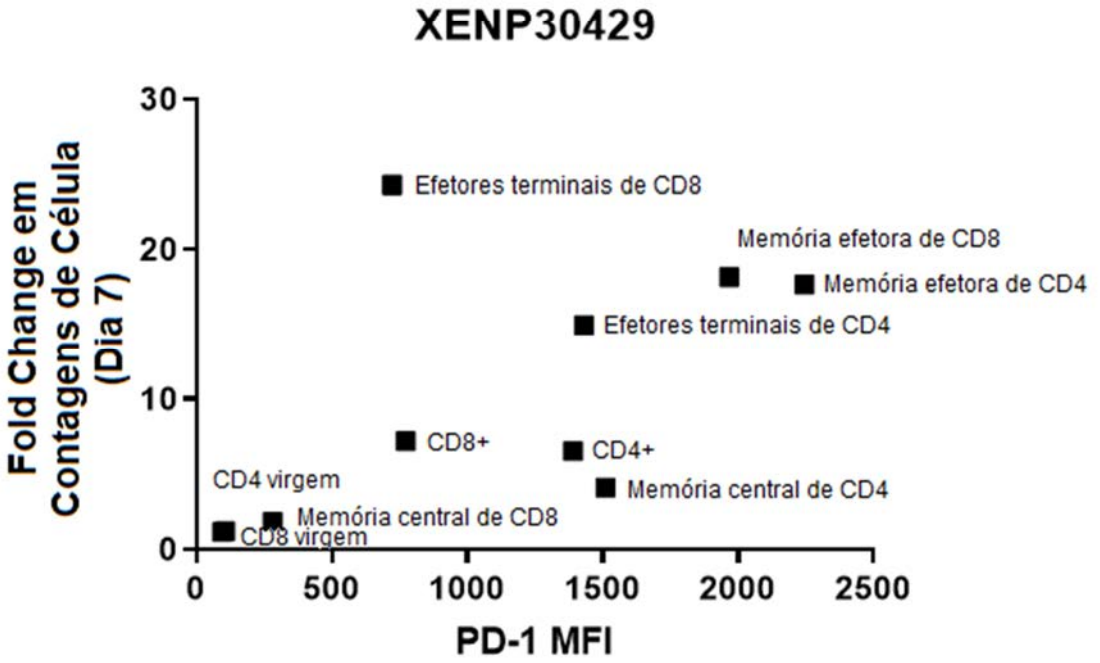


Figura 103

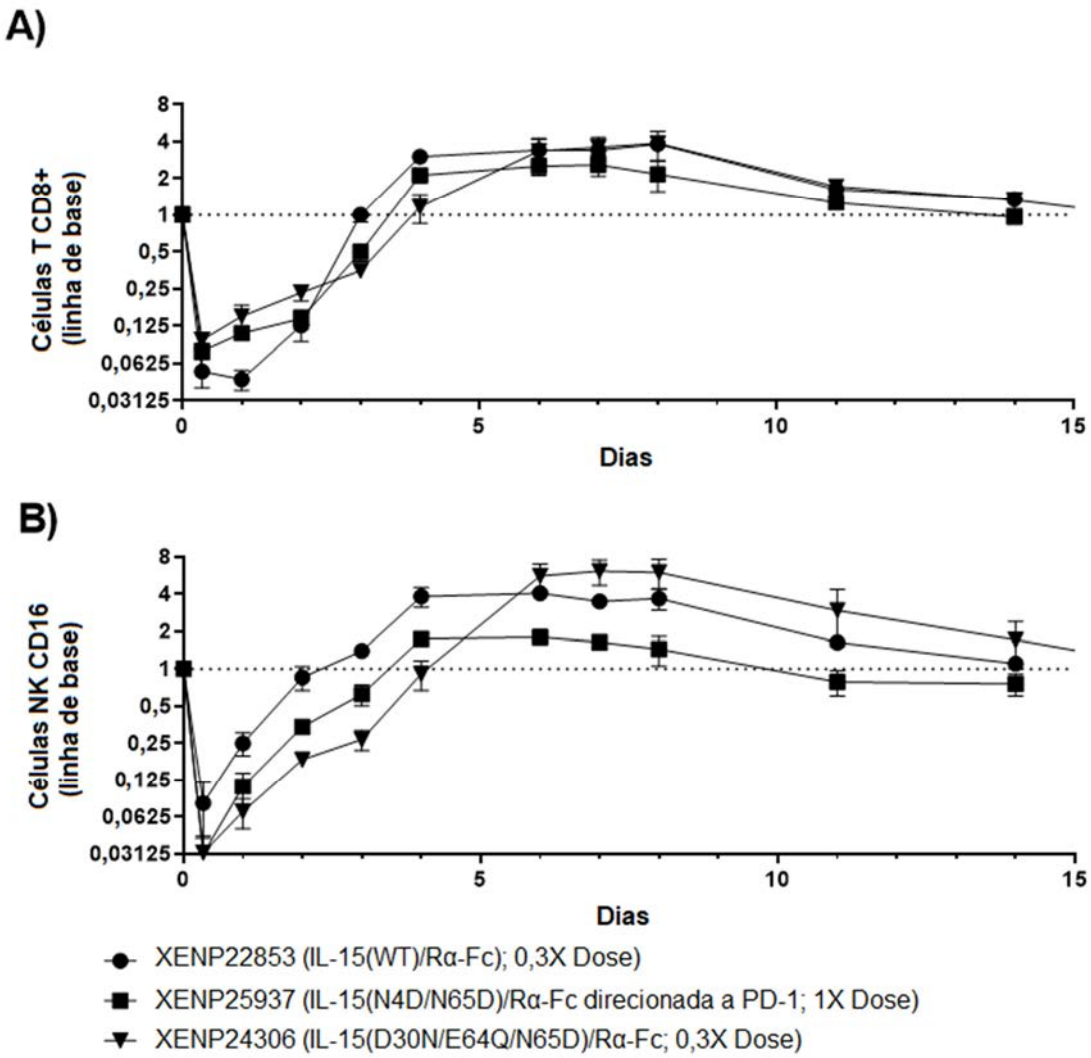

A)
Células T CD8+ (linha de base)
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
0,0625
0,03125
0
5
10
15
Dias
B)
Células NK CD16 (linha de base)
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
0,0625
0,03125
0
5
10
15
Dias
XENP22853 (IL-15(WT)/Rα-Fc); 0,3X Dose)
XENP25937 (IL-15(N4D/N65D)/Rα-Fc direcionada a PD-1; 1X Dose)
XENP24306 (IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc; 0,3X Dose)

Figura 104

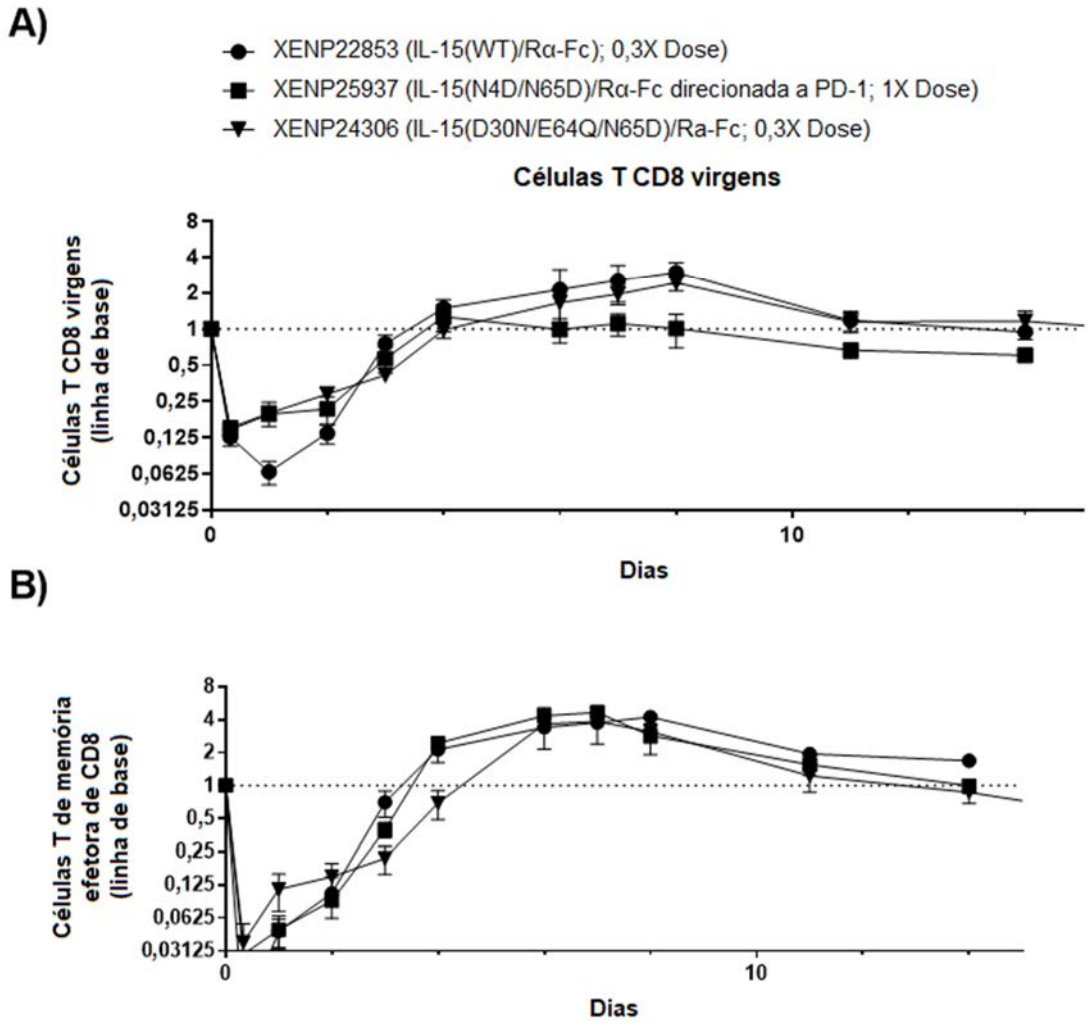

A)
XENP22853 (IL-15(WT)/Rα-Fc); 0,3X Dose)
XENP25937 (IL-15(N4D/N65D)/Rα-Fc direcionada a PD-1; 1X Dose)
XENP24306 (IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Ra-Fc; 0,3X Dose)
Células T CD8 virgens
Células T CD8 virgens (linha de base)
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
0,0625
0,03125
0
10
Dias
B)
Células T de memória efetora de CD8 (linha de base)
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
0,0625
0,03125
0
10
Dias

Figura 105A

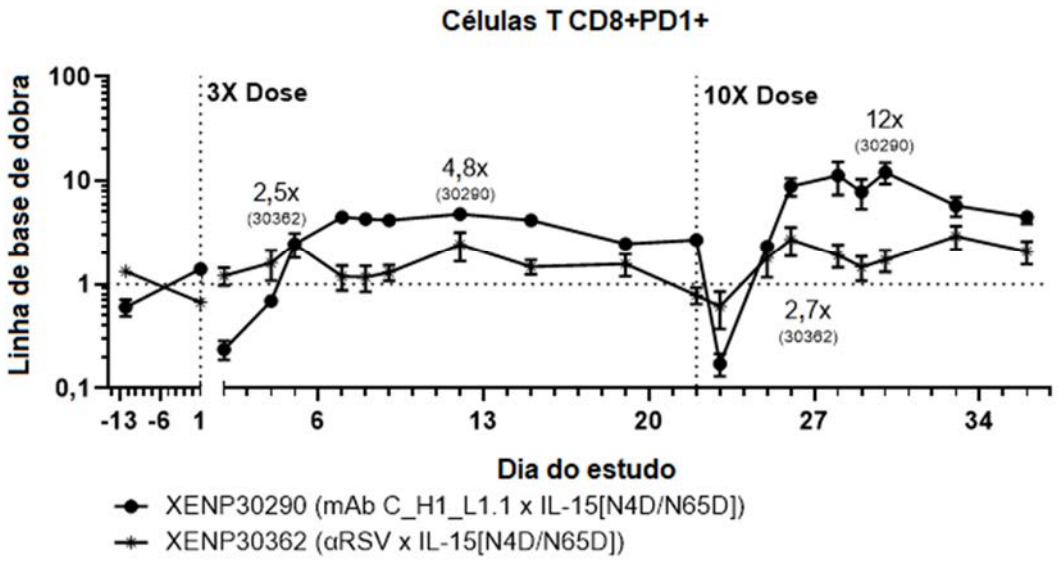


Figura 105B

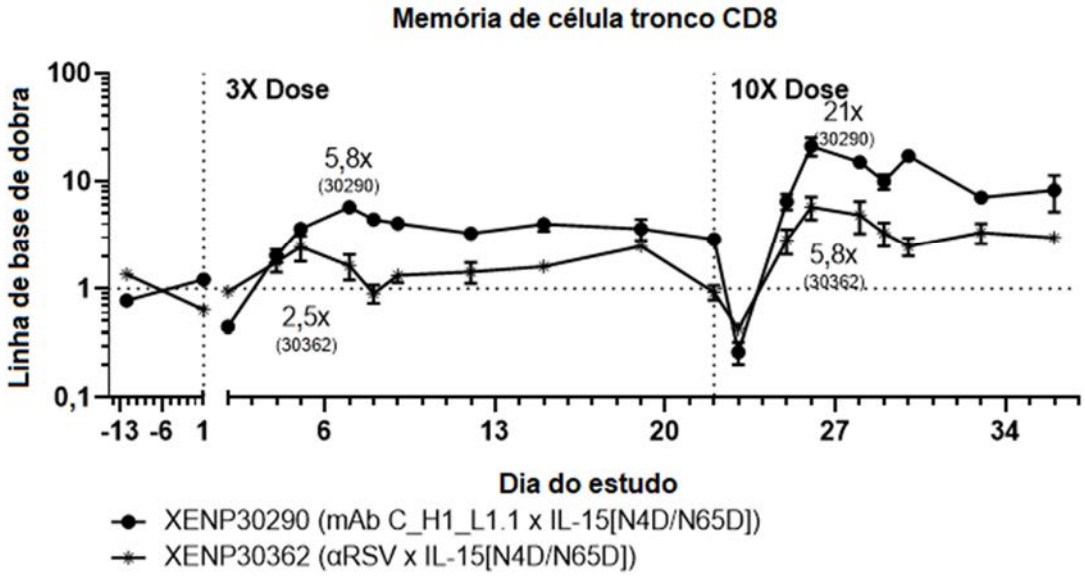


Figura 105C

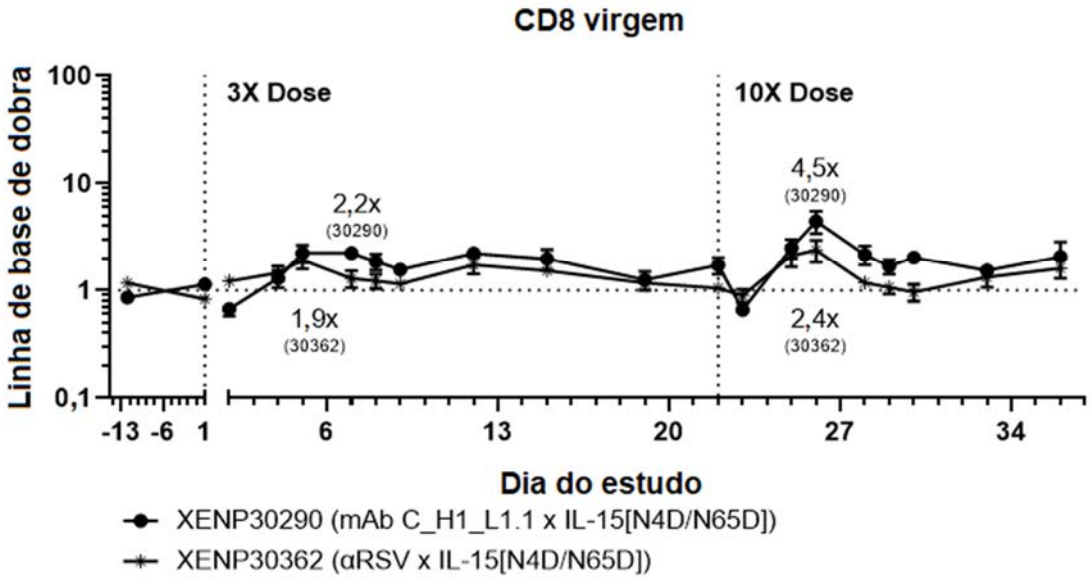


Figura 105D

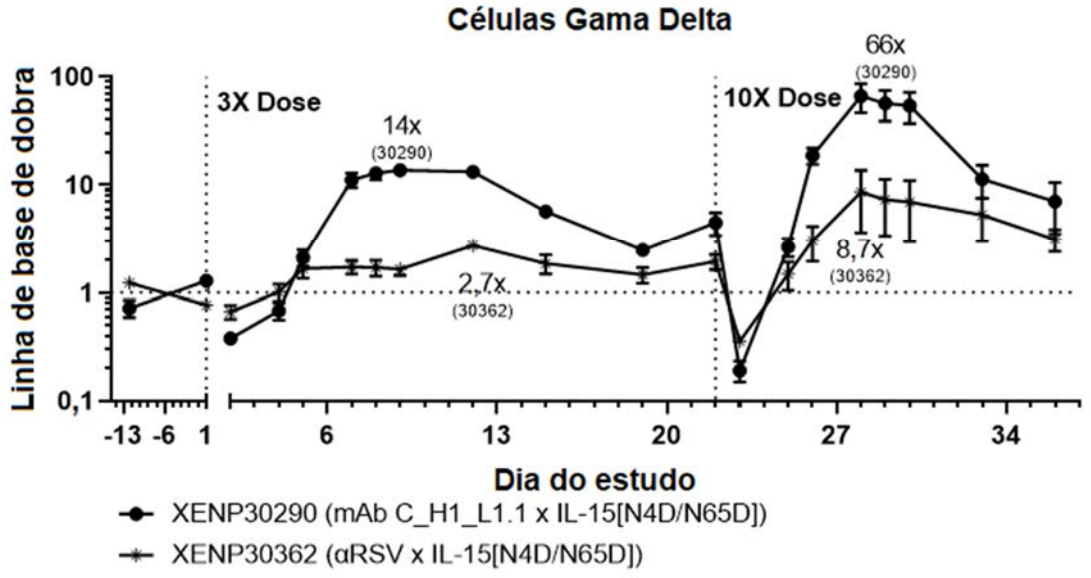


Figura 105E

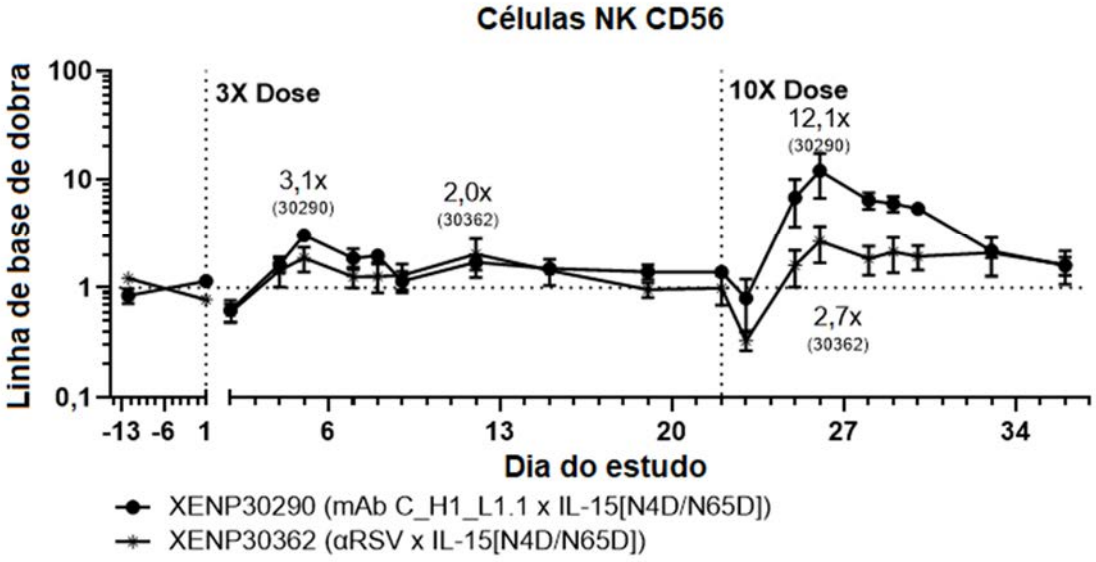

Células NK CD56
Linha de base de dobra
100
10
1
0,1
3X Dose
10X Dose
3,1x
(30290)
2,0x
(30362)
12,1x
(30290)
2,7x
(30362)
-13 -6 1
6
13
20
27
34
Dia do estudo
XENP30290 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15[N4D/N65D])
XENP30362 (αRSV x IL-15[N4D/N65D])

Figura 106A

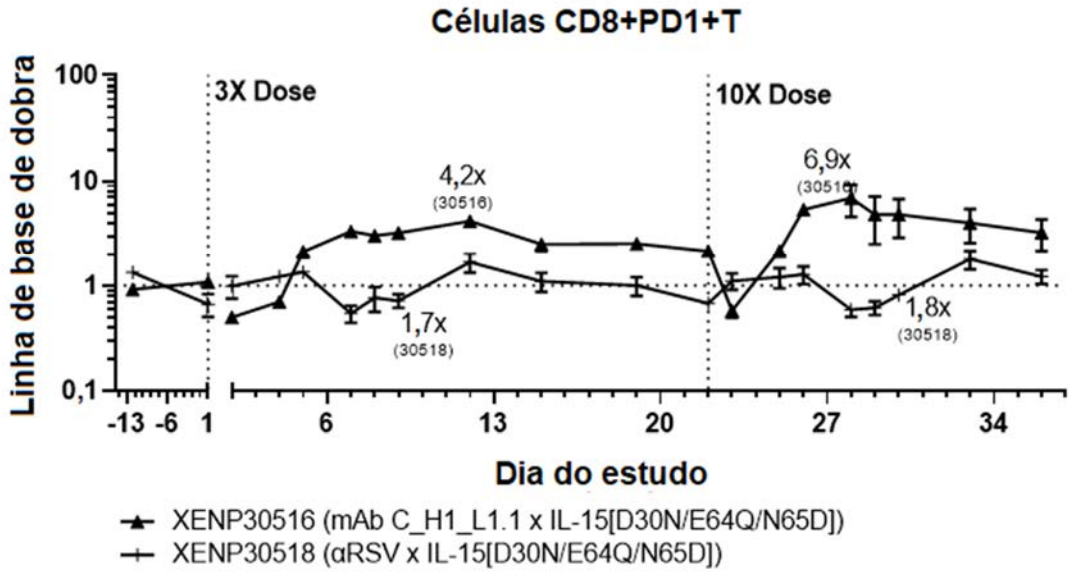


Figura 106B

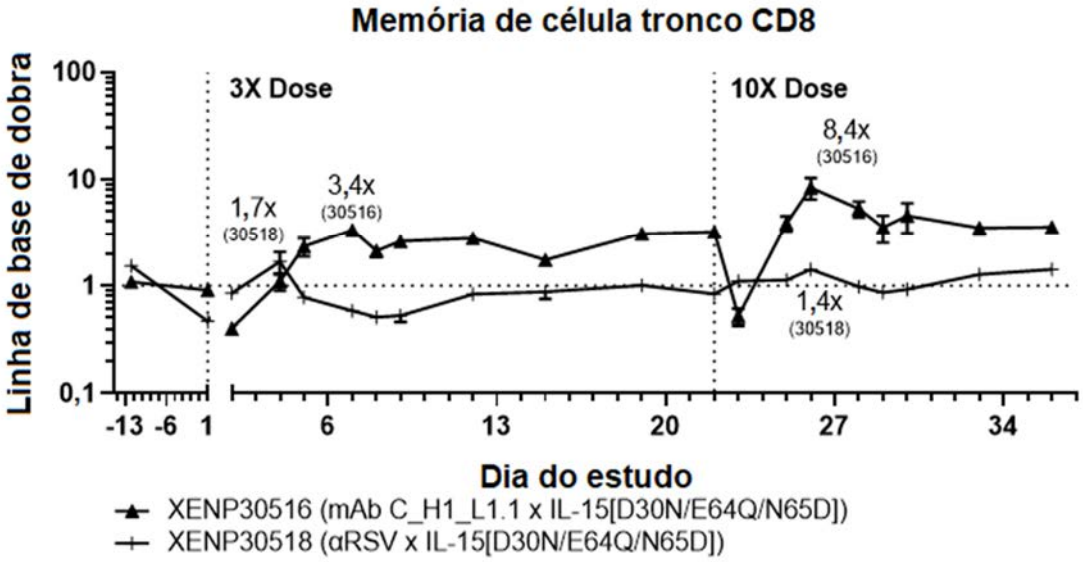


Figura 106C

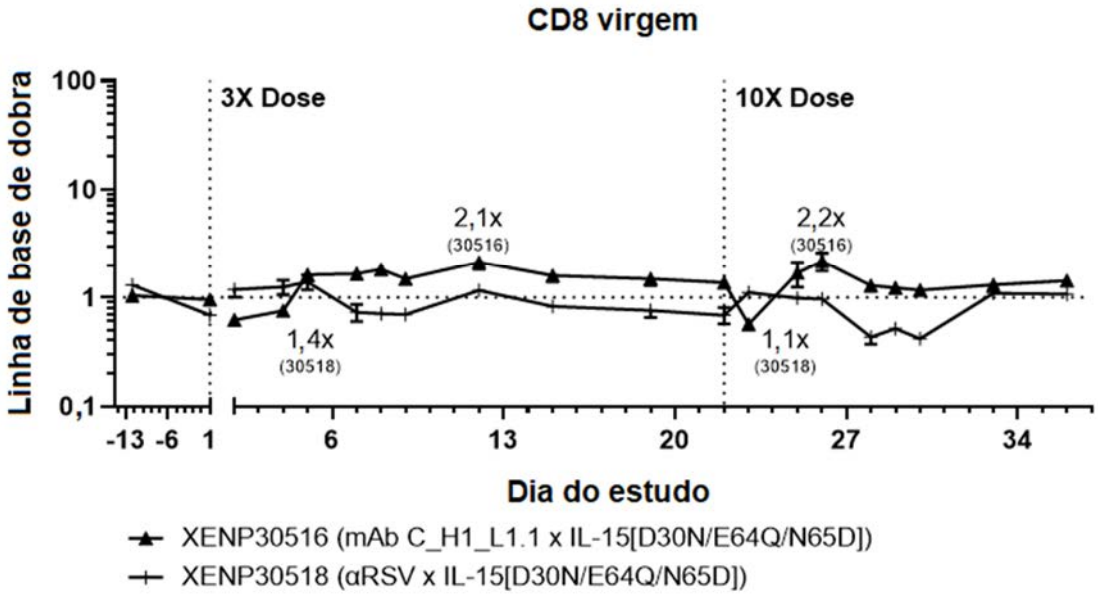


Figura 106D

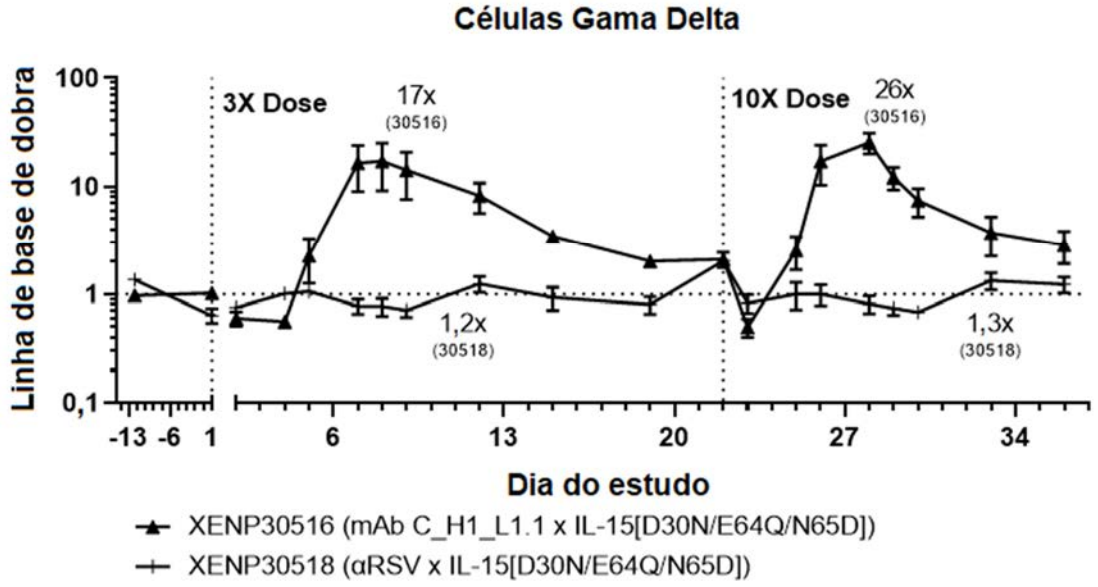


Figura 106E

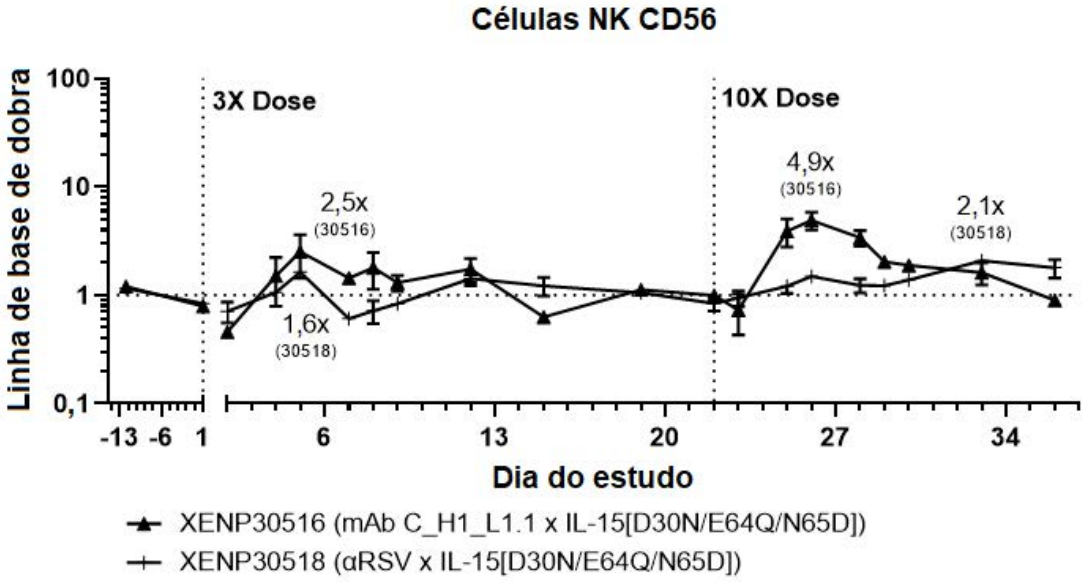

Células NK CD56
Linha de base de dobra
100
10
1
0,1
3X Dose
10X Dose
2,5x
(30516)
1,6x
(30518)
4,9x
(30516)
2,1x
(30518)
-13 -6 1
6
13
20
27
34
Dia do estudo
XENP30516 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15[D30N/E64Q/N65D])
XENP30518 (αRSV x IL-15[D30N/E64Q/N65D])

Figura 107

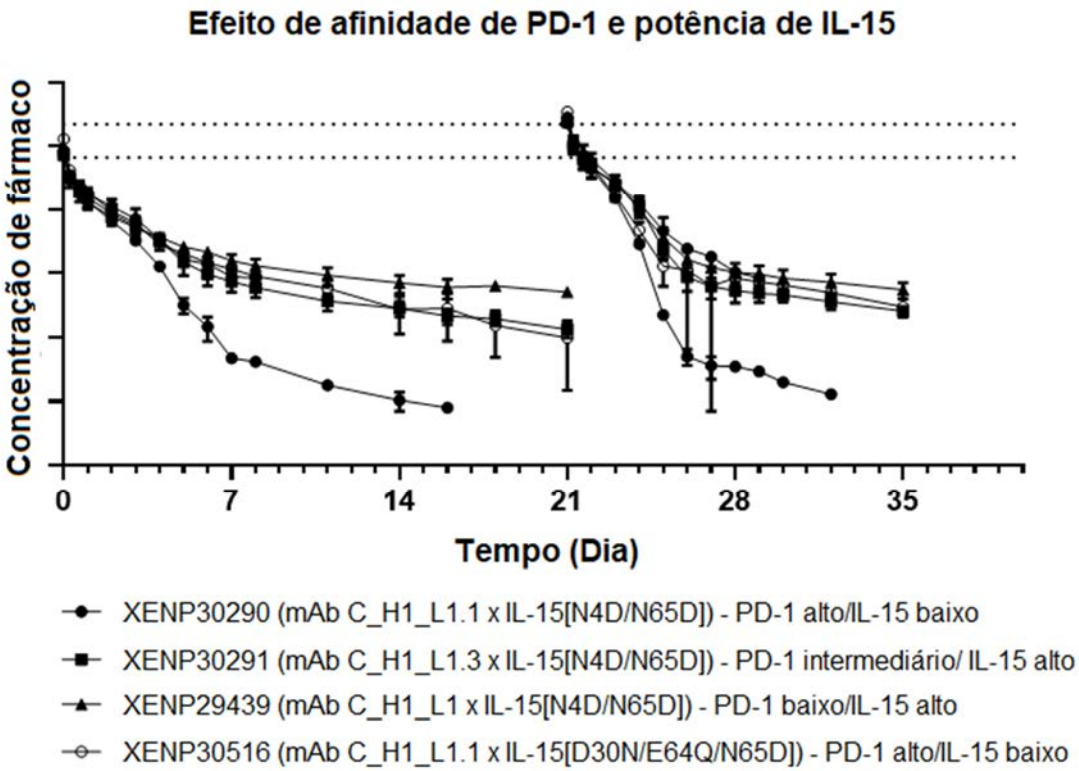

Efeito de afinidade de PD-1 e potência de IL-15
Concentração de fármaco
0
7
14
21
28
35
Tempo (Dia)
XENP30290 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15[N4D/N65D]) - PD-1 alto/IL-15 baixo
XENP30291 (mAb C_H1_L1.3 x IL-15[N4D/N65D]) - PD-1 intermediário/ IL-15 alto
XENP29439 (mAb C_H1_L1 x IL-15[N4D/N65D]) - PD-1 baixo/IL-15 alto
XENP30516 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15[D30N/E64Q/N65D]) - PD-1 alto/IL-15 baixo

Figura 108

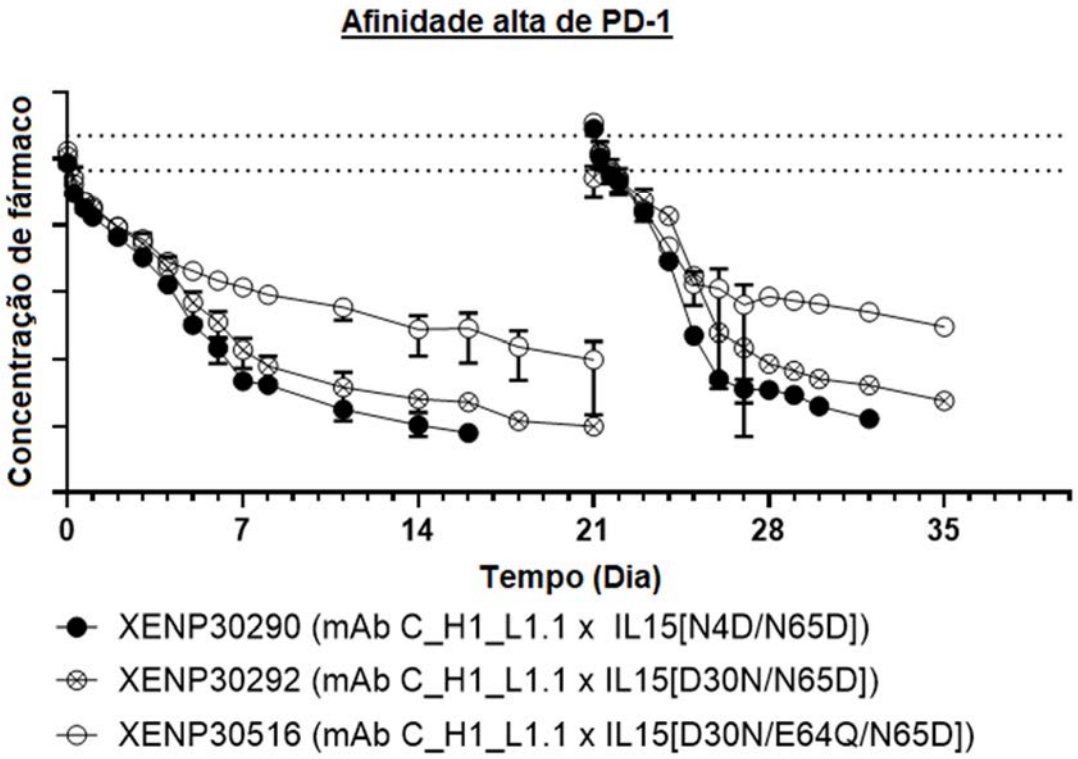

Afinidade alta de PD-1
Concentração de fármaco
0
7
14
21
28
35
Tempo (Dia)
XENP30290 (mAb C_H1_L1.1 x IL15[N4D/N65D])
XENP30292 (mAb C_H1_L1.1 x IL15[D30N/N65D])
XENP30516 (mAb C_H1_L1.1 x IL15[D30N/E64Q/N65D])

Figura 109

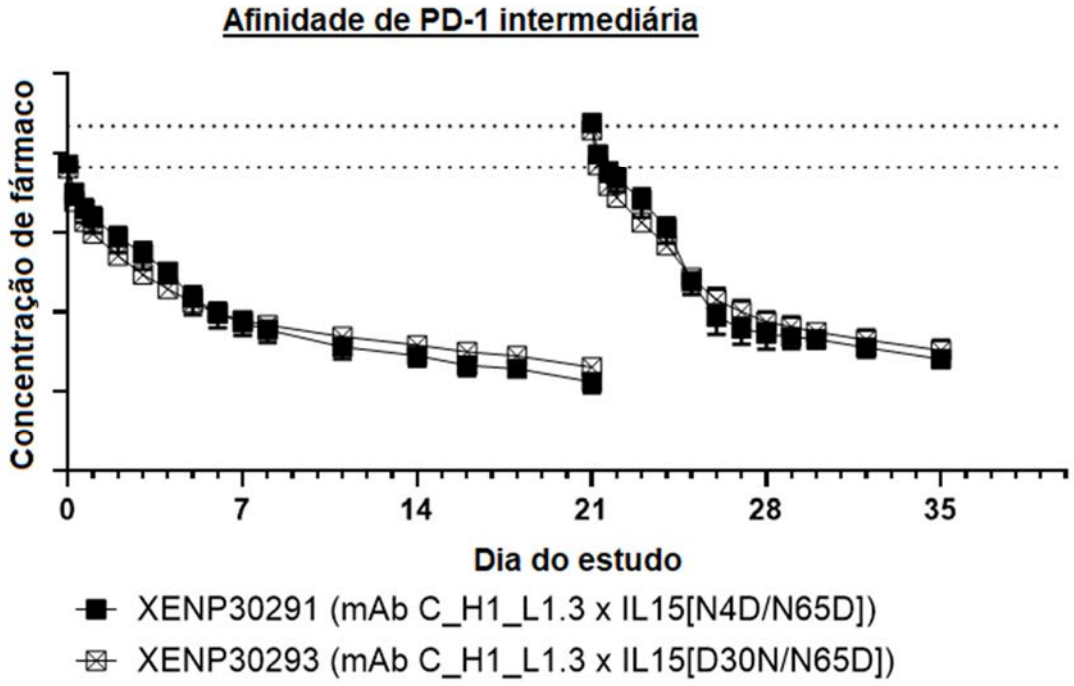

Afinidade de PD-1 intermediária
Concentração de fármaco
0
7
14
21
28
35
Dia do estudo
XENP30291 (mAb C_H1_L1.3 x IL15[N4D/N65D])
XENP30293 (mAb C_H1_L1.3 x IL15[D30N/N65D])

Figura 110

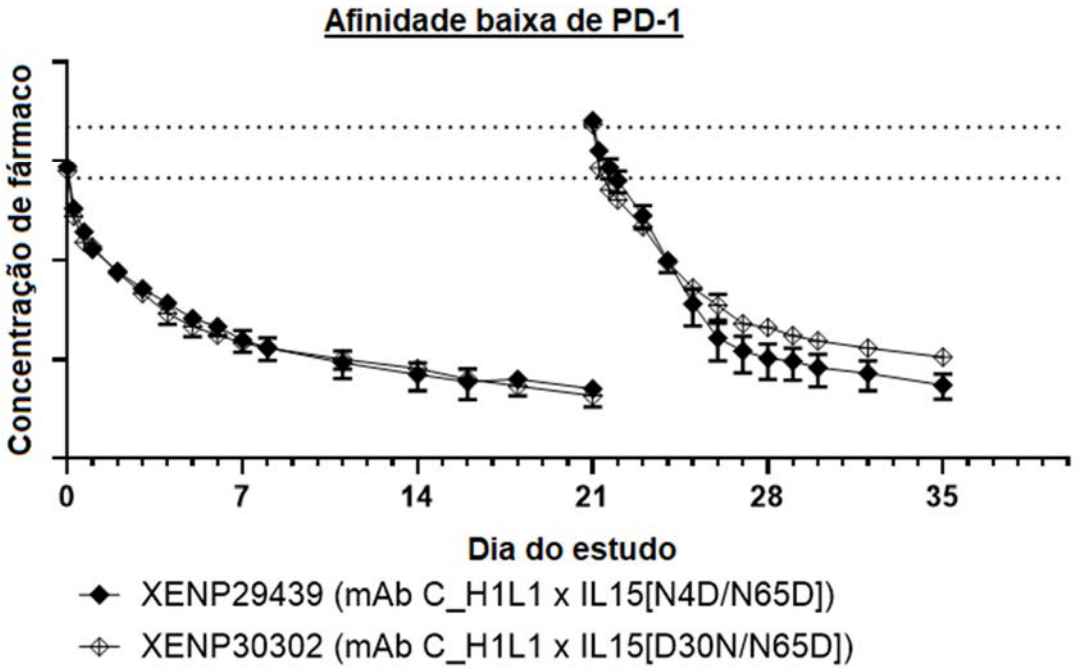

Afinidade baixa de PD-1
Concentração de fármaco
0
7
14
21
28
35
Dia do estudo
XENP29439 (mAb C_H1L1 x IL15[N4D/N65D])
XENP30302 (mAb C_H1L1 x IL15[D30N/N65D])

Figura 111

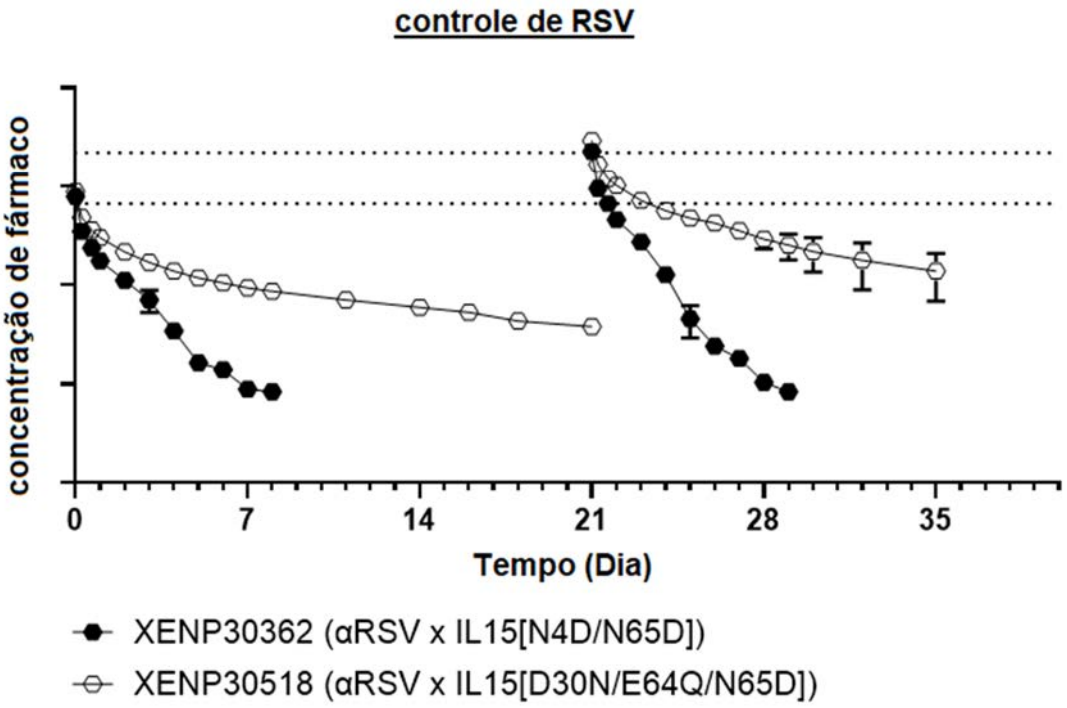

controle de RSV
concentração de fármaco
0
7
14
21
28
35
Tempo (Dia)
XENP30362 (αRSV x IL15[N4D/N65D])
XENP30518 (αRSV x IL15[D30N/E64Q/N65D])

Figura 112A

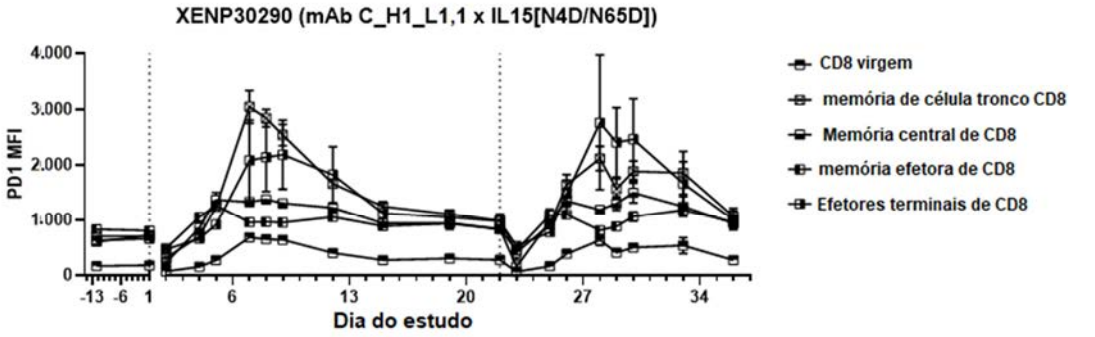


Figura 112B

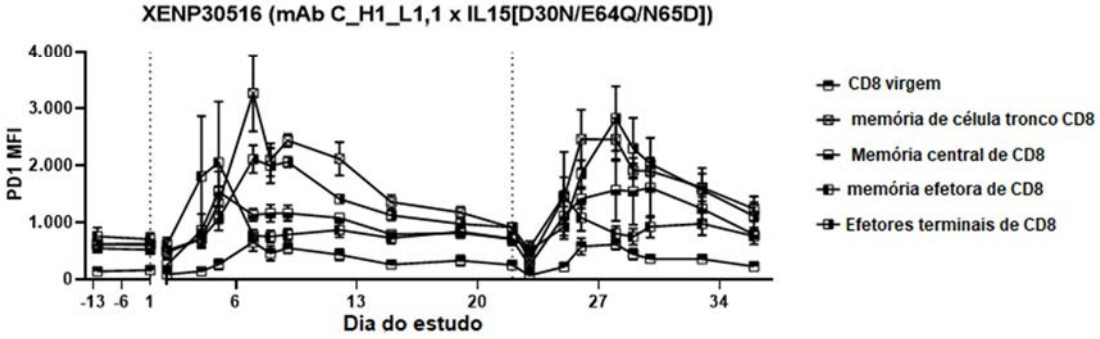


Figura 112C

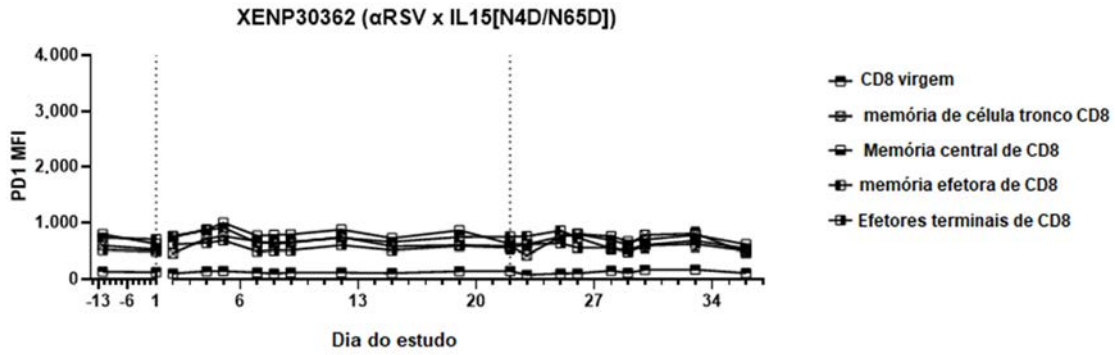

XENP30362 (αRSV x IL15[N4D/N65D])
PD1 MFI
4.000
3.000
2.000
1.000
0
-13 -6 1 6 13 20 27 34
Dia do estudo
CD8 virgem
memória de célula tronco CD8
Memória central de CD8
memória efetora de CD8
Efetores terminais de CD8

Figura 113

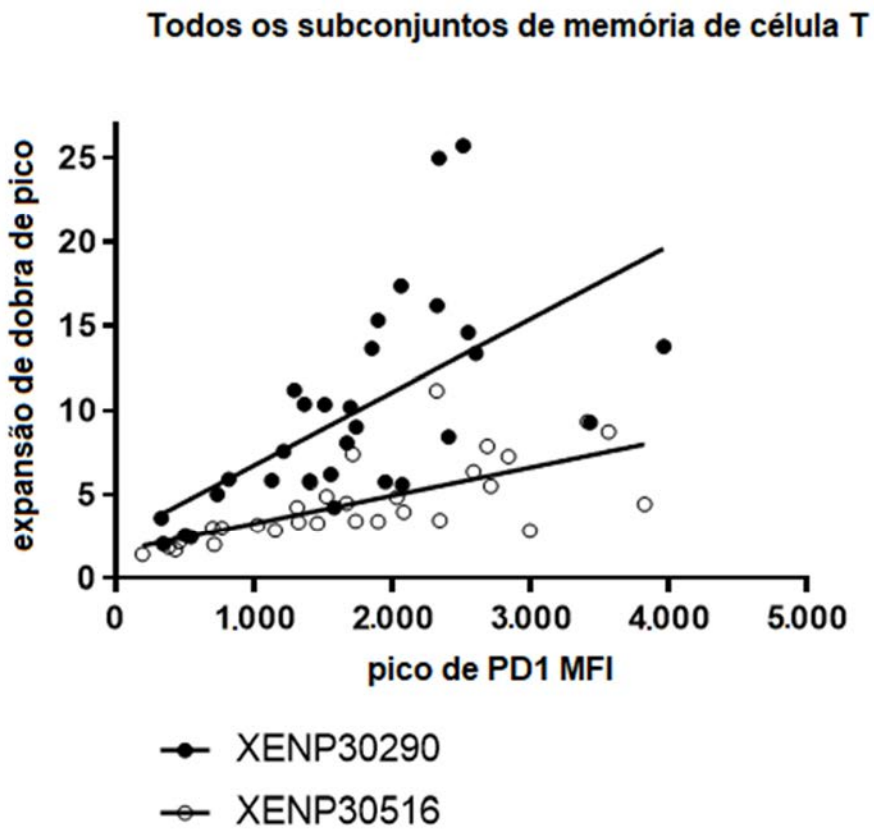

Todos os subconjuntos de memória de célula T
expansão de dobra de pico
25
20
15
10
5
0
0
1.000
2.000
3.000
4.000
5.000
pico de PD1 MFI
XENP30290
XENP30516

Figura 114A

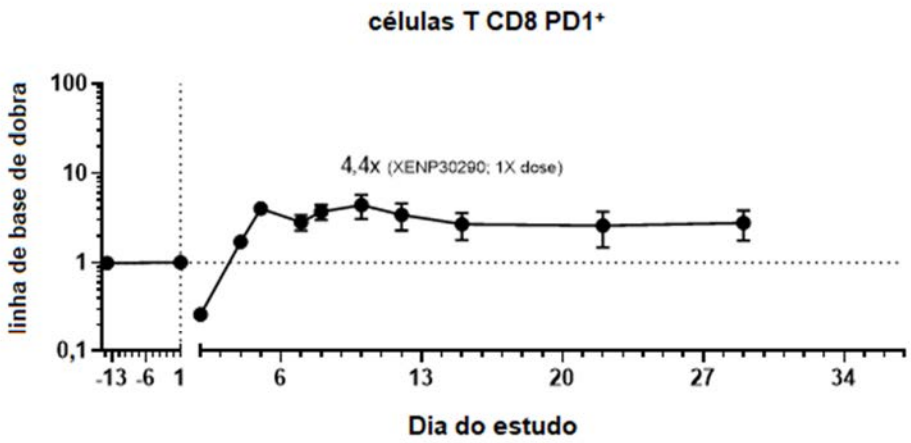


Figura 114B

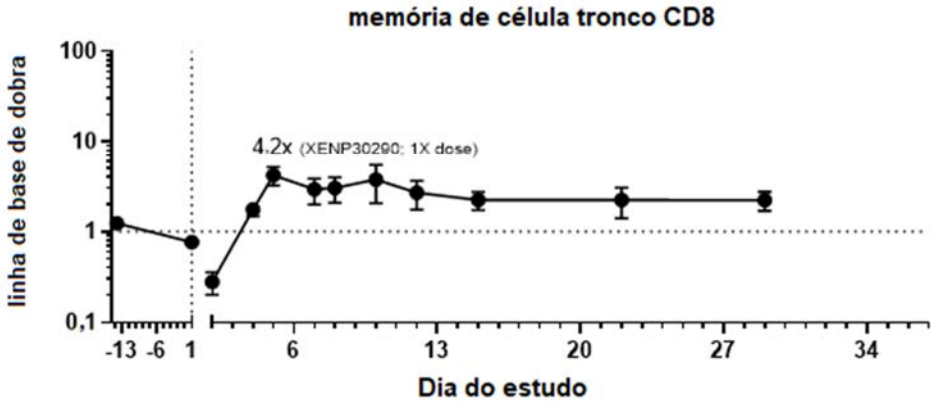


Figura 114C

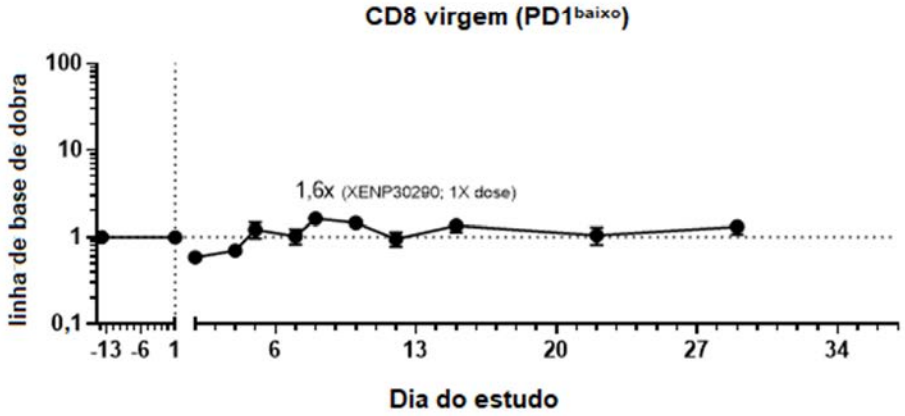


Figura 114D

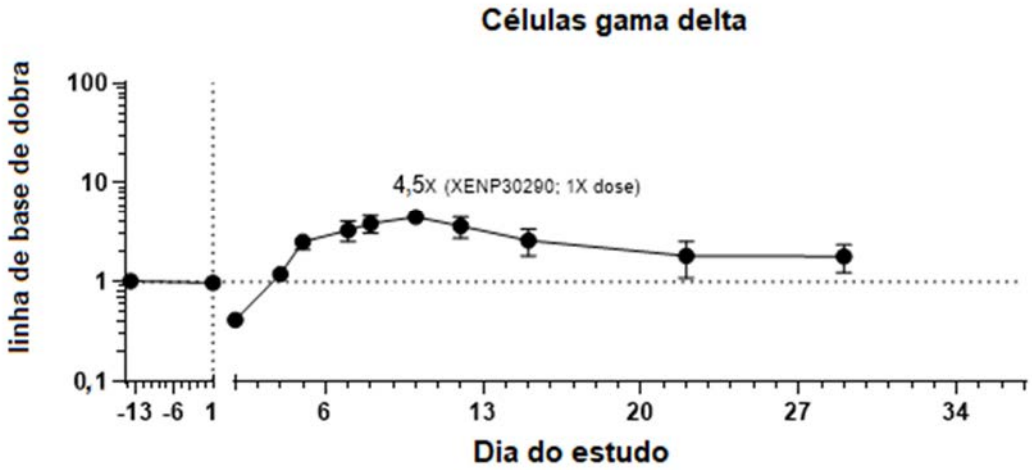


Figura 114E

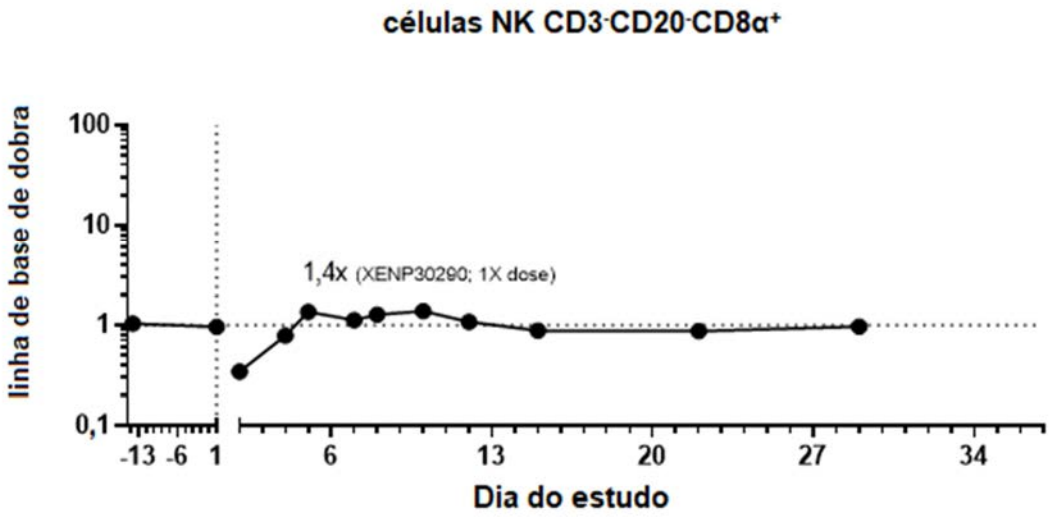


Figura 115A

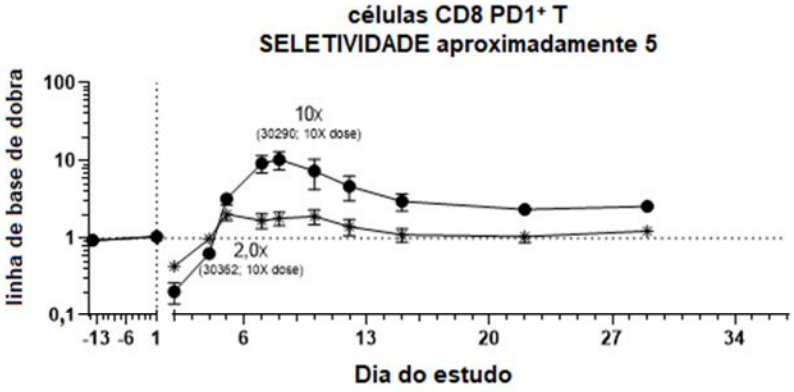


Figura 115B

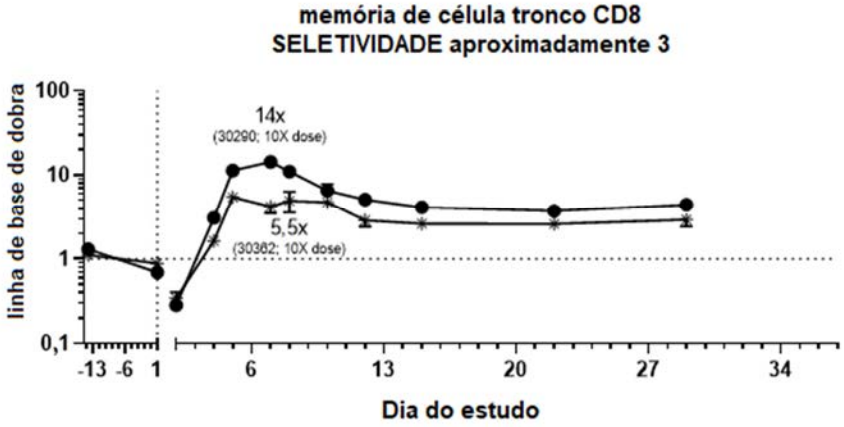


Figura 115C

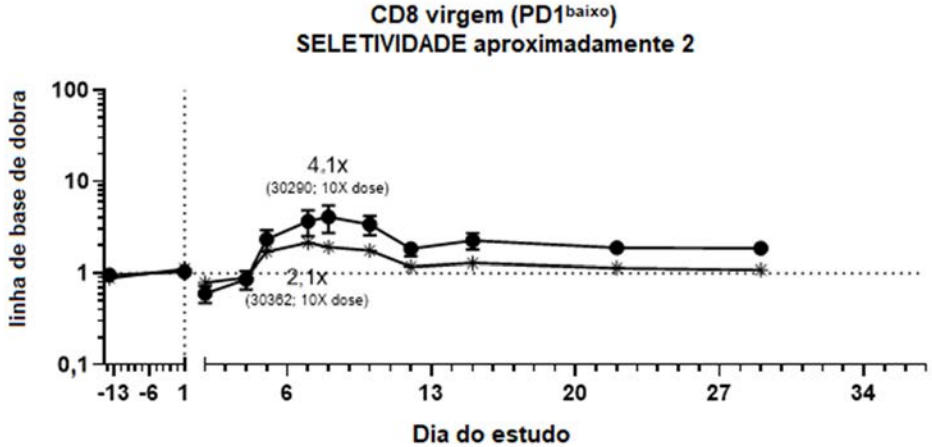


Figura 115D

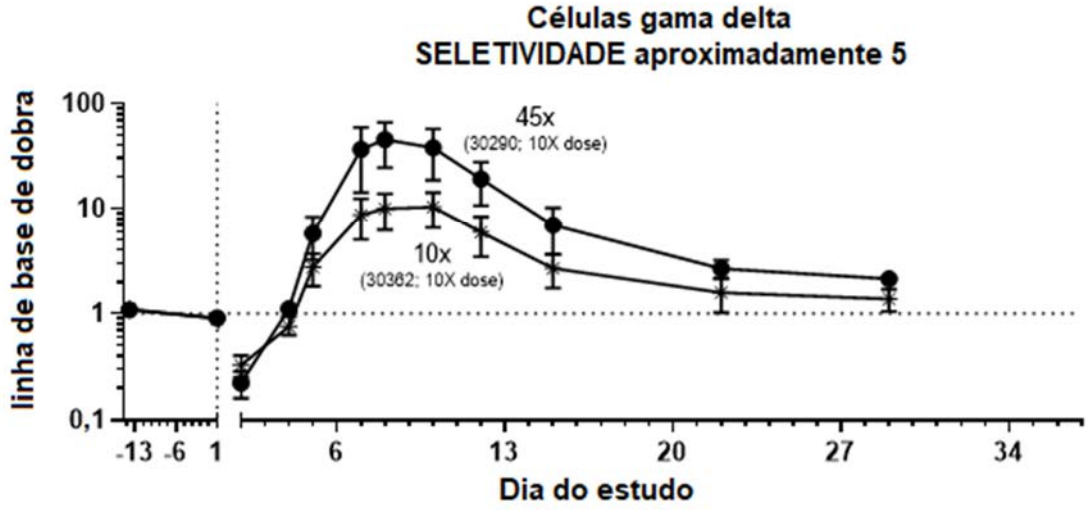


Figura 115E

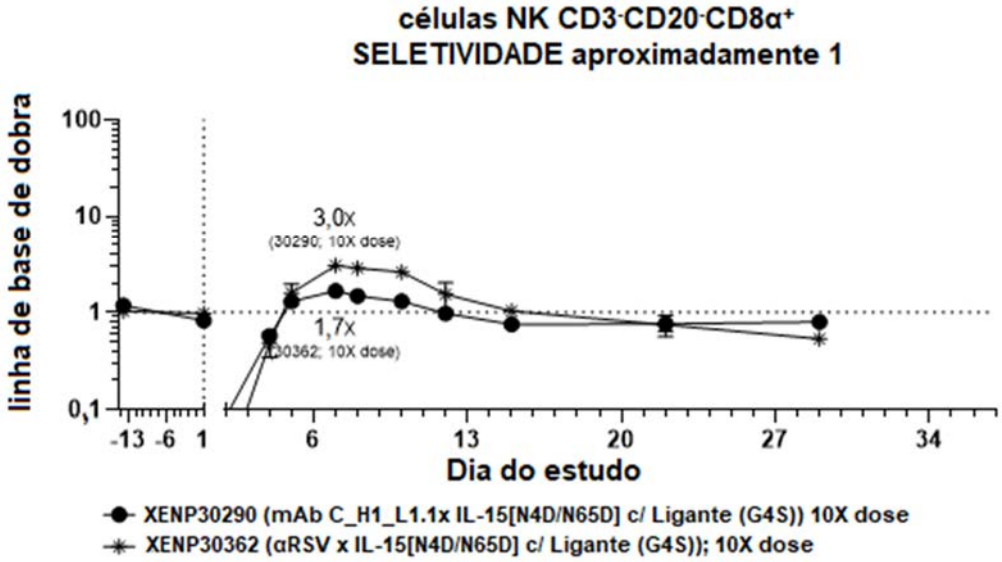


Figura 116A

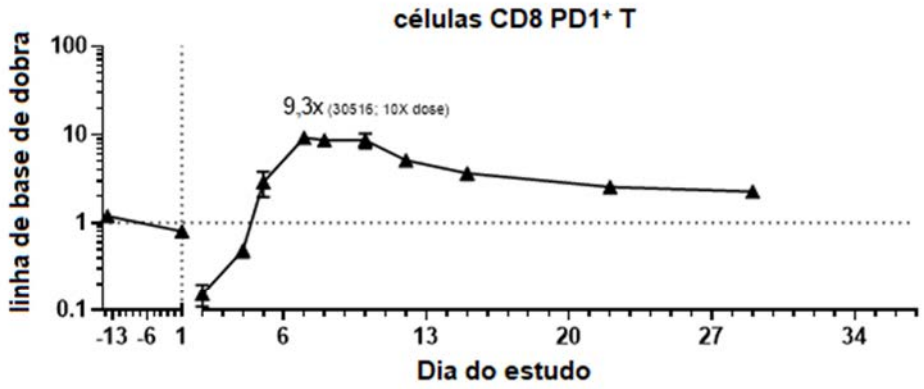


Figura 116B

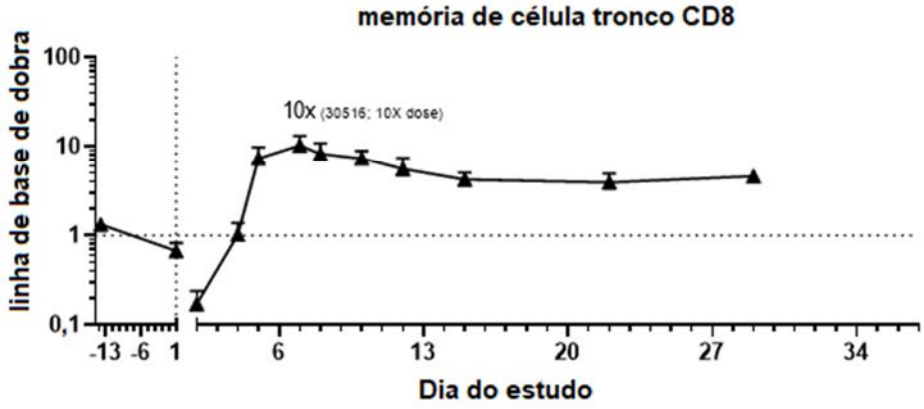


Figura 116C

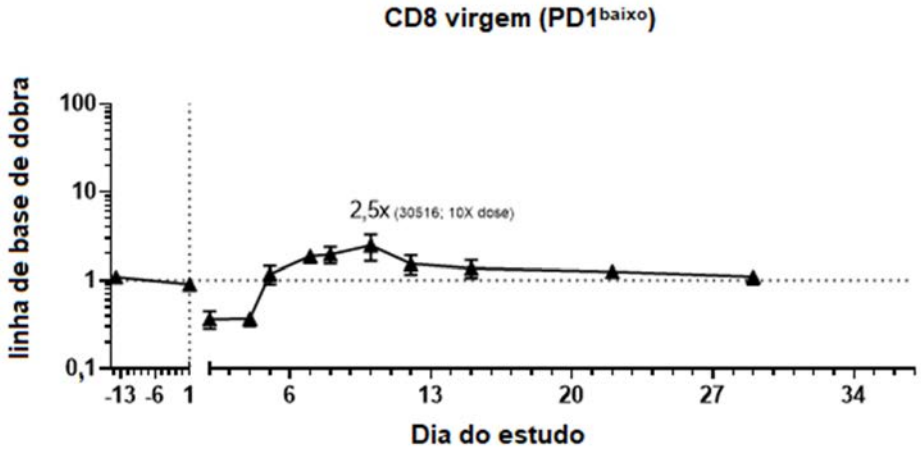


Figura 116D

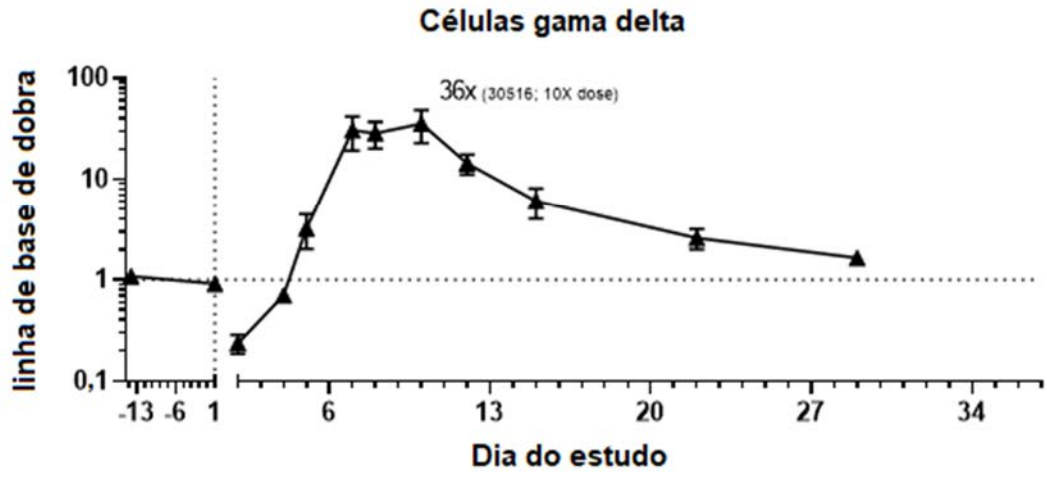


Figura 116E

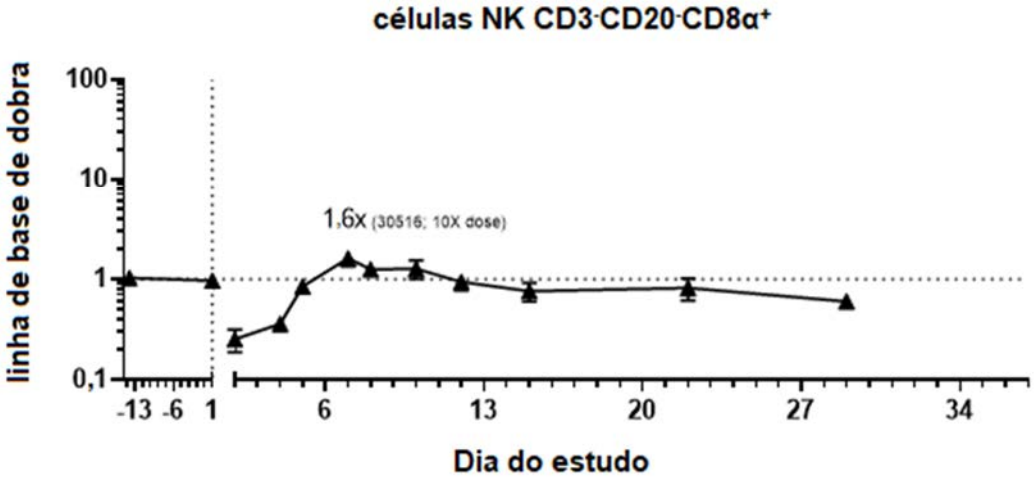


Figura 117A

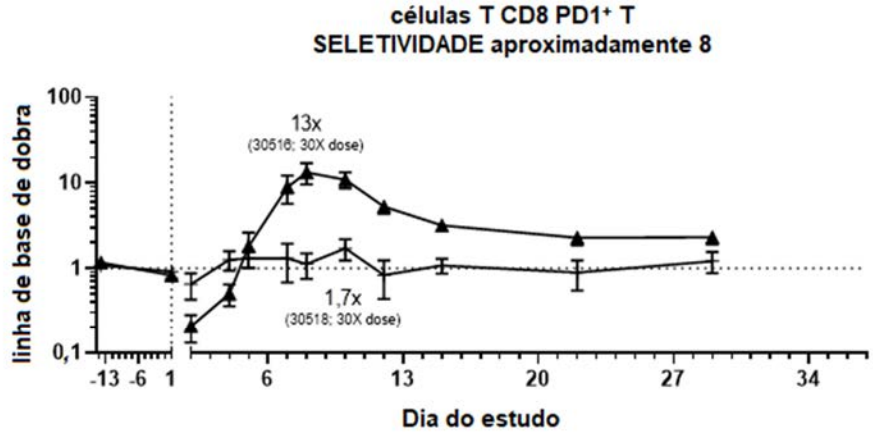


Figura 117B

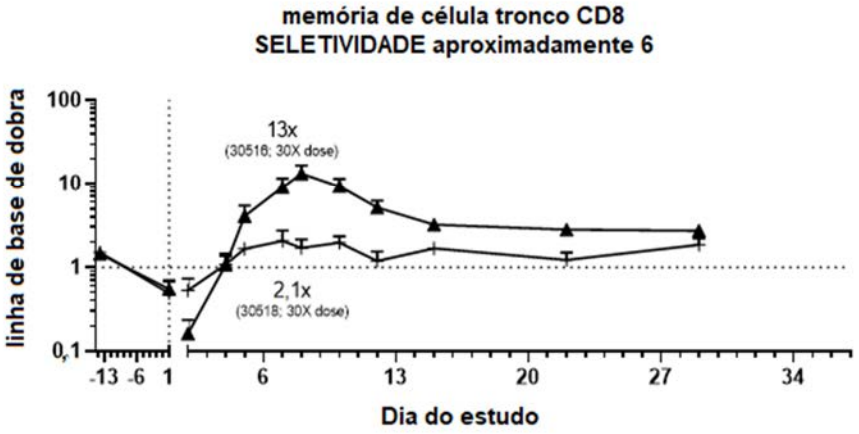


Figura 117C

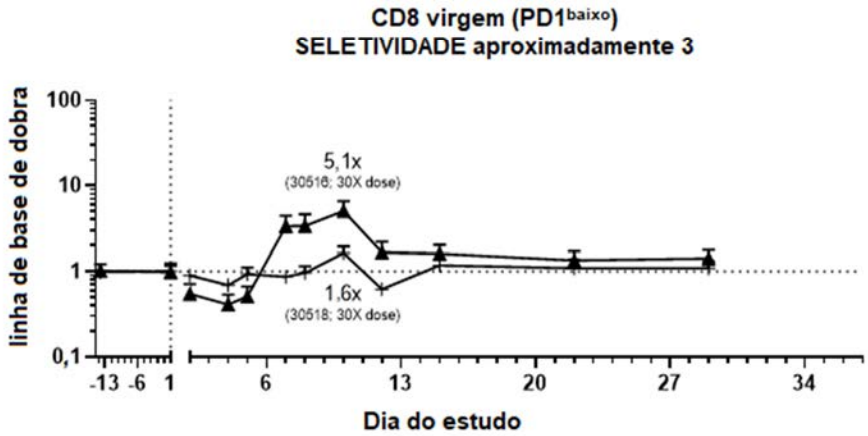


Figura 117D

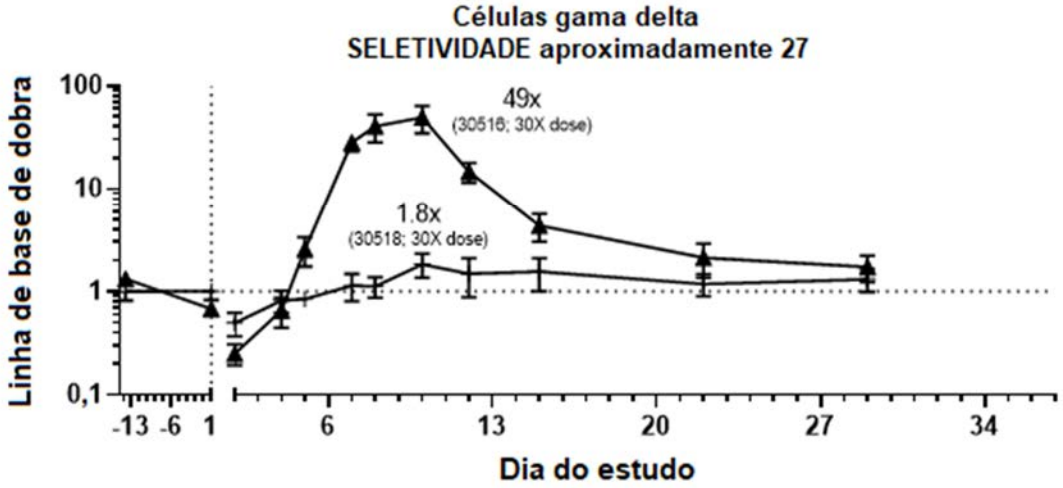


Figura 117E

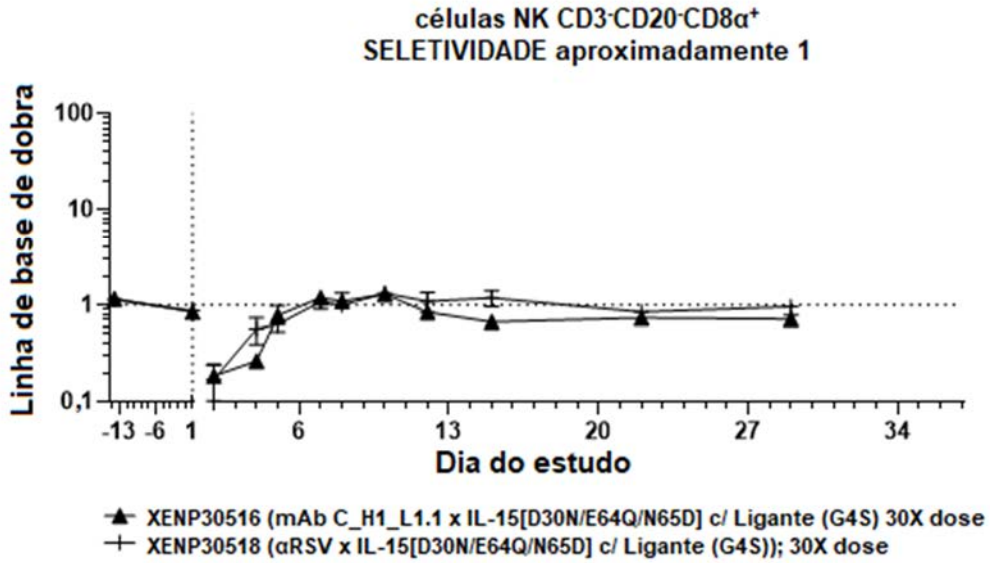


Figura 118

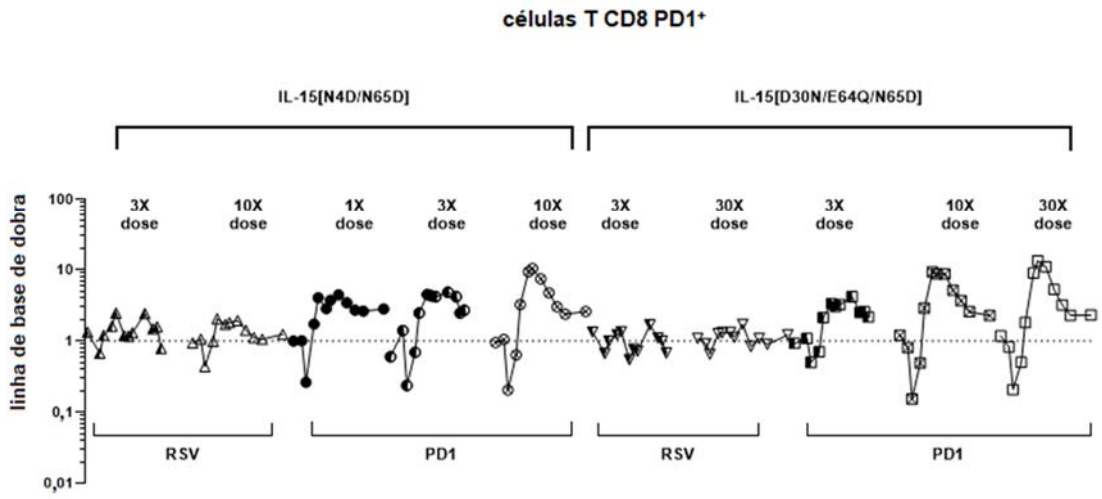

células T CD8 PD1+
IL-15[N4D/N65D]
IL-15[D30N/E64Q/N65D]
linha de base de dobra
100
10
1
0,1
0,01
3X dose
10X dose
1X dose
3X dose
10X dose
3X dose
30X dose
3X dose
10X dose
30X dose
RSV
PD1
RSV
PD1

Figura 119A

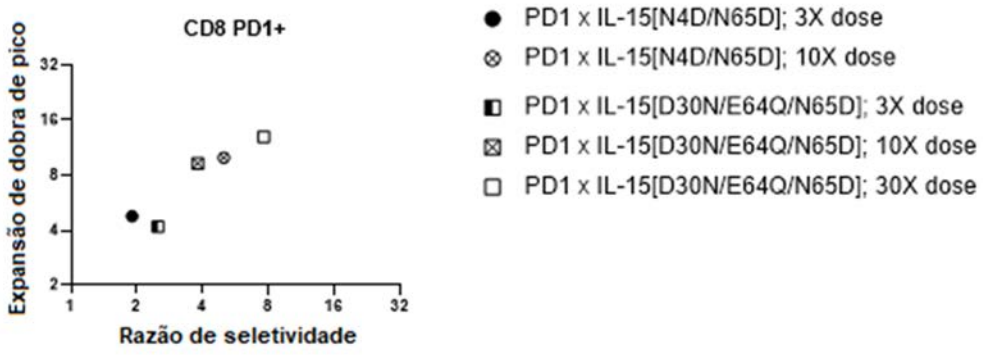


Figura 119B

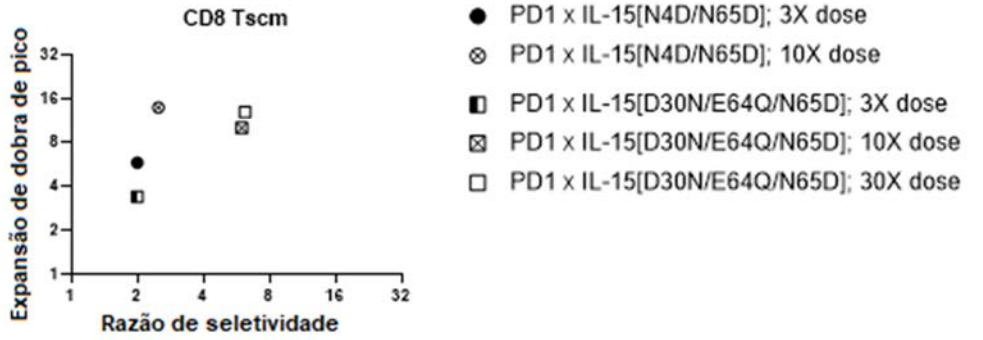


Figura 119C

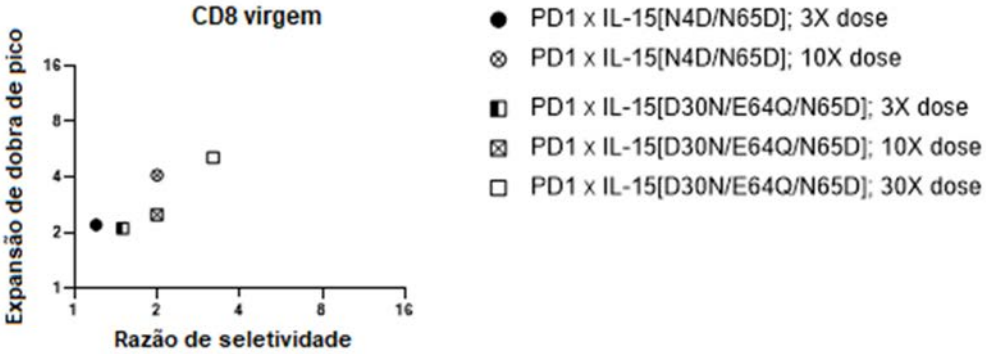


Figura 119D

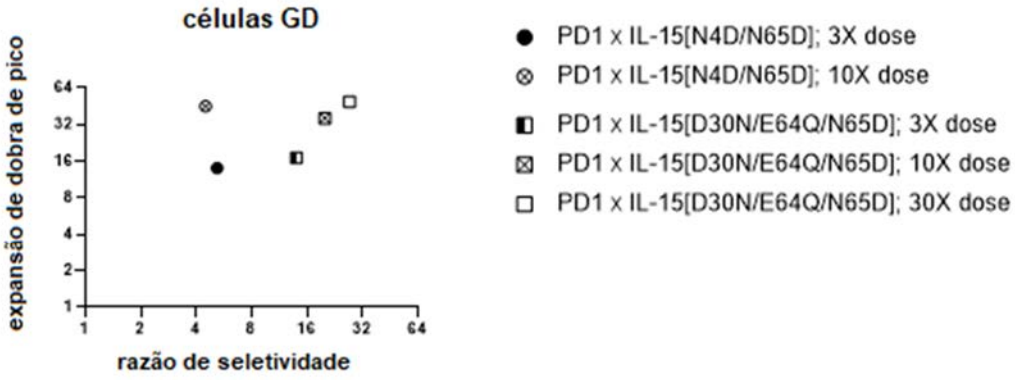


Figura 119E

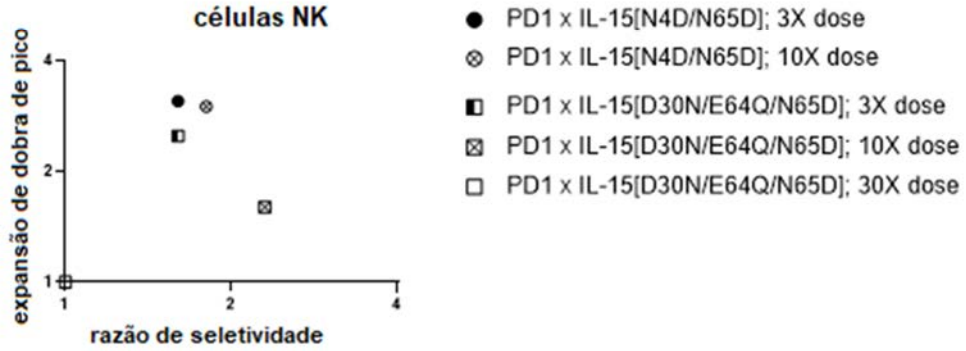


Figura 120

heterodímero de Fc de IL15 humana-$(GGGGS)_1$ x IL15Rα(Sushi) humana-$(GGGGS)_1$

Cadeia 1 - human_IL15_$(GGGGS)_1$_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 627)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCK
ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - human_IL15Rα(Sushi)_$(GGGGS)_1$_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 628)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPC
PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>XENP022821 - human_IL15_N65D_$(GGGGS)_1$-human_IL15Rα(Sushi)_$(GGGGS)_1$_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 - human_IL15_N65D_$(GGGGS)_1$ (17692) (SEQ ID NO: 629)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVEDLIILANNSLSSNGNVTESGCK
ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 - human_IL15Rα(Sushi)_$(GGGGS)_1$_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (15908) (SEQ ID NO: 630)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPC
PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>XENP024045 human_IL15_D30N/E64Q/N65D_(GGGGS)1-human_IL15Rα(Sushi)_(GGGGS)1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

Cadeia 1 – human_IL15_D30N/E64Q/N65D_(GGGGS)1_Fc(216)_IgG1_pI(-)_Isosteric_A_C220S/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 631)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNVTESGCK
ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Cadeia 2 – human_IL15Rα(Sushi)_(GGGGS)1_ Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 632)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPC
PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 121

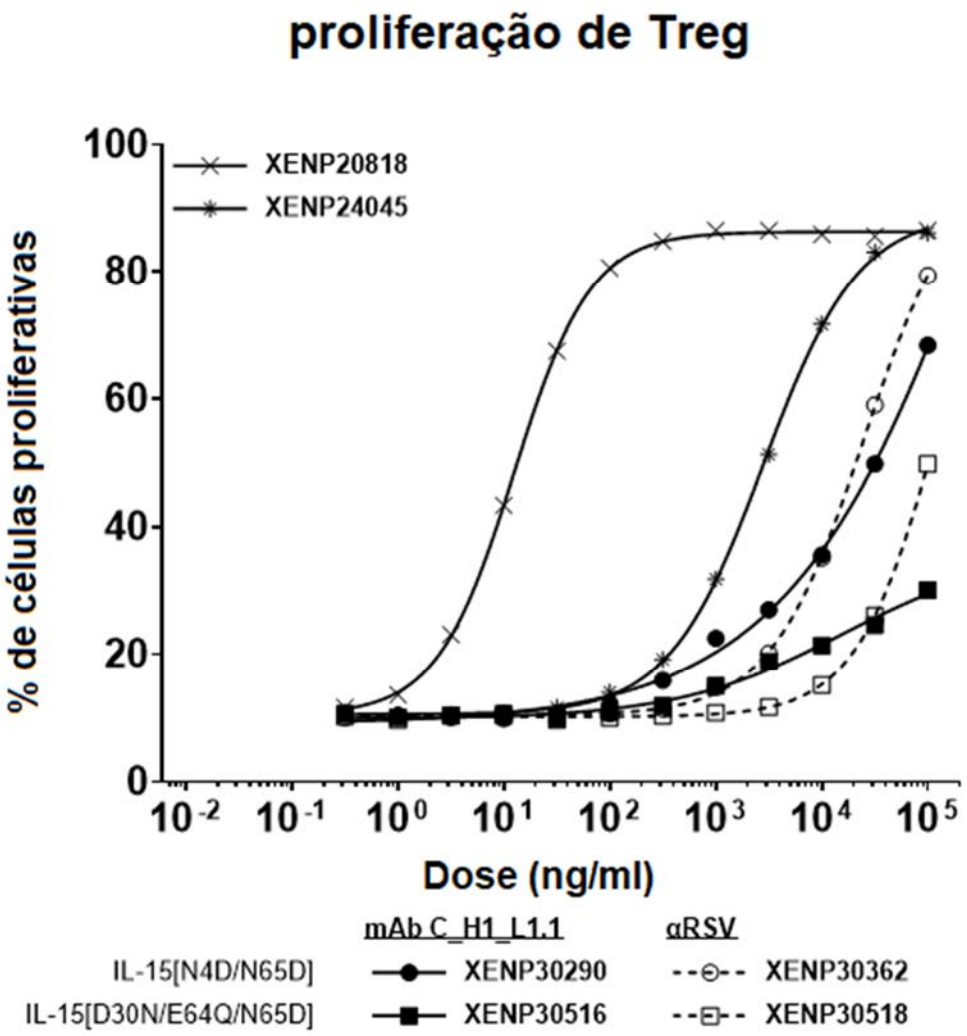

proliferação de Treg
% de células proliferativas
100
80
60
40
20
0
XENP20818
XENP24045
10-2
10-1
100
101
102
103
104
105
Dose (ng/ml)
mAb C_H1_L1.1
αRSV
IL-15[N4D/N65D]
XENP30290
XENP30362
IL-15[D30N/E64Q/N65D]
XENP30516
XENP30518

Figura 122A

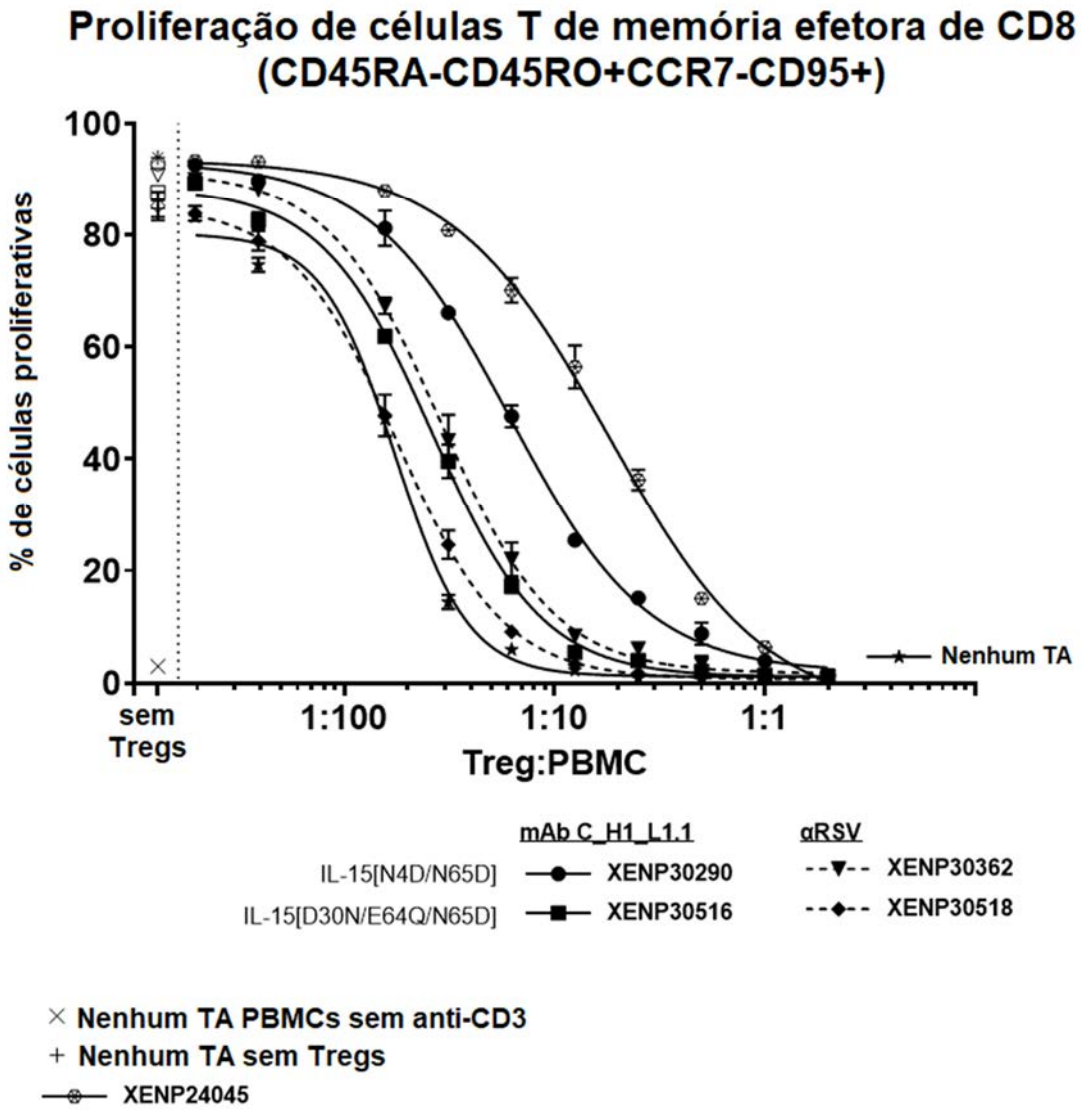

Proliferação de células T de memória efetora de CD8
(CD45RA-CD45RO+CCR7-CD95+)
% de células proliferativas
100
80
60
40
20
0
sem Tregs
1:100
1:10
1:1
Treg:PBMC
Nenhum TA
mAb C_H1_L1.1
αRSV
IL-15[N4D/N65D]
XENP30290
XENP30362
IL-15[D30N/E64Q/N65D]
XENP30516
XENP30518
× Nenhum TA PBMCs sem anti-CD3
+ Nenhum TA sem Tregs
XENP24045

Figura 122B

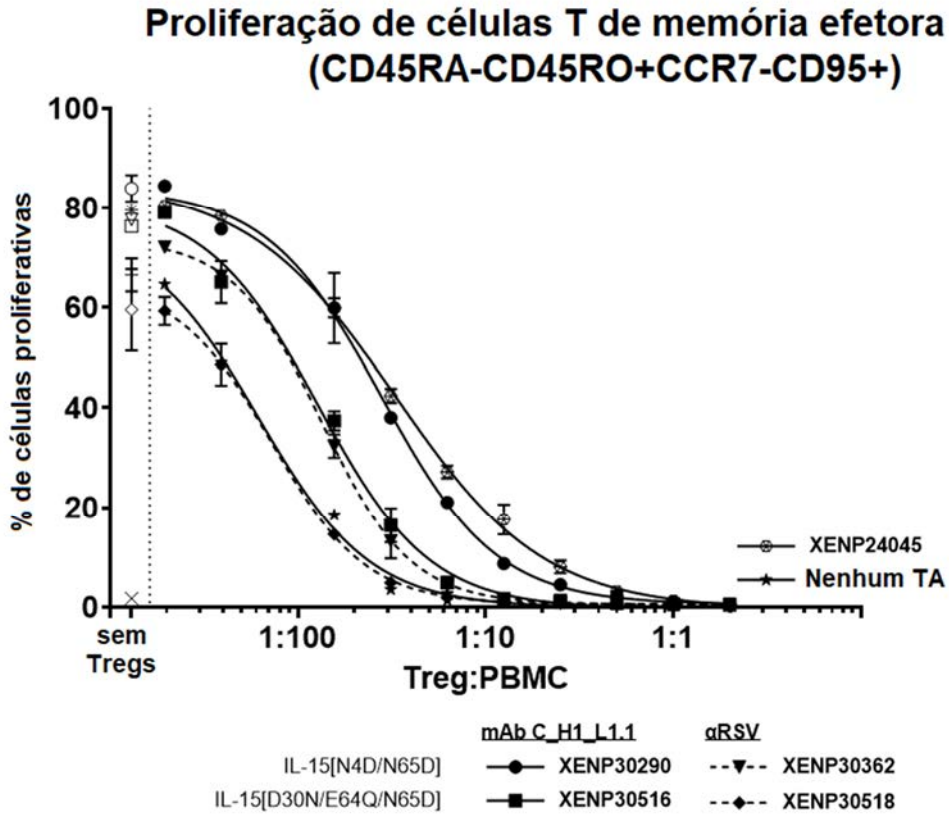

Proliferação de células T de memória efetora de CD4
(CD45RA-CD45RO+CCR7-CD95+)
% de células proliferativas
100
80
60
40
20
0
sem Tregs
1:100
1:10
1:1
Treg:PBMC
XENP24045
Nenhum TA
mAb C_H1_L1.1
αRSV
IL-15[N4D/N65D]
XENP30290
XENP30362
IL-15[D30N/E64Q/N65D]
XENP30516
XENP30518

Figura 123A

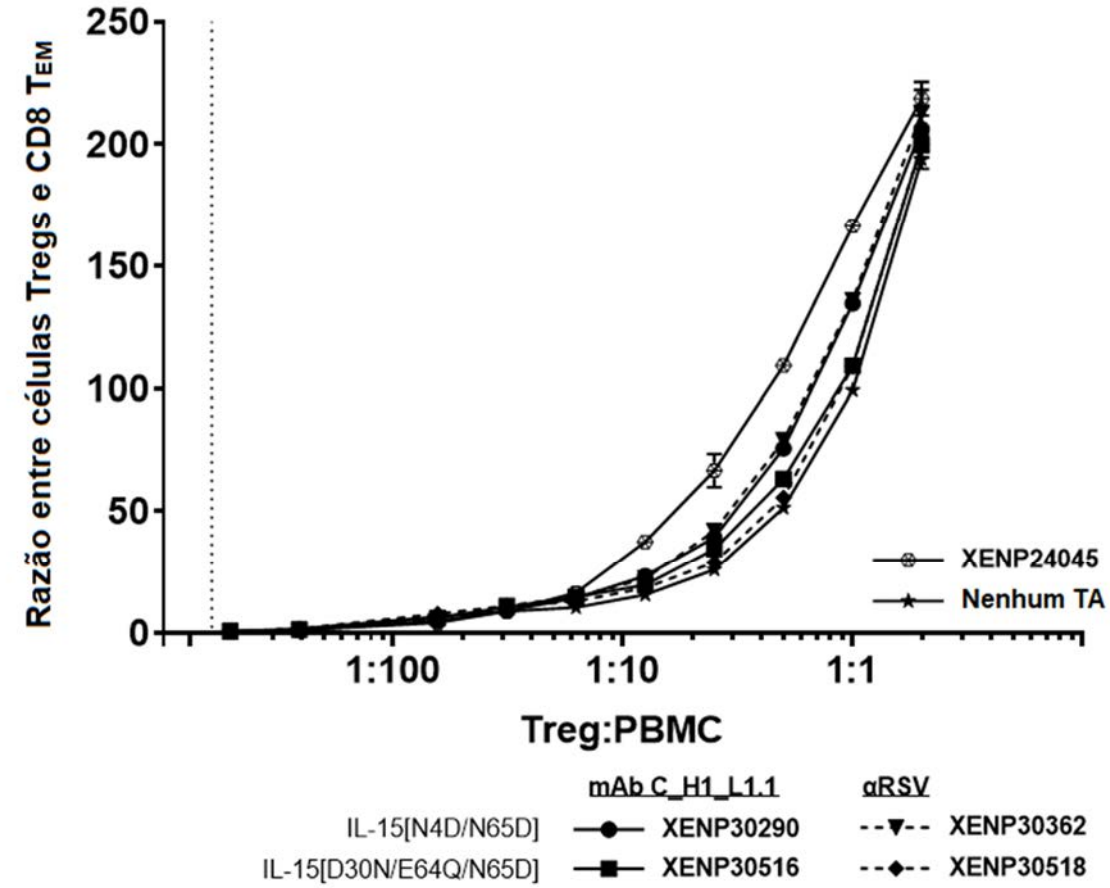

Razão entre células Tregs e CD8 TEM
250
200
150
100
50
0
1:100
1:10
1:1
Treg:PBMC
XENP24045
Nenhum TA
mAb C_H1_L1.1
αRSV
IL-15[N4D/N65D]
XENP30290
XENP30362
IL-15[D30N/E64Q/N65D]
XENP30516
XENP30518

Figura 123B

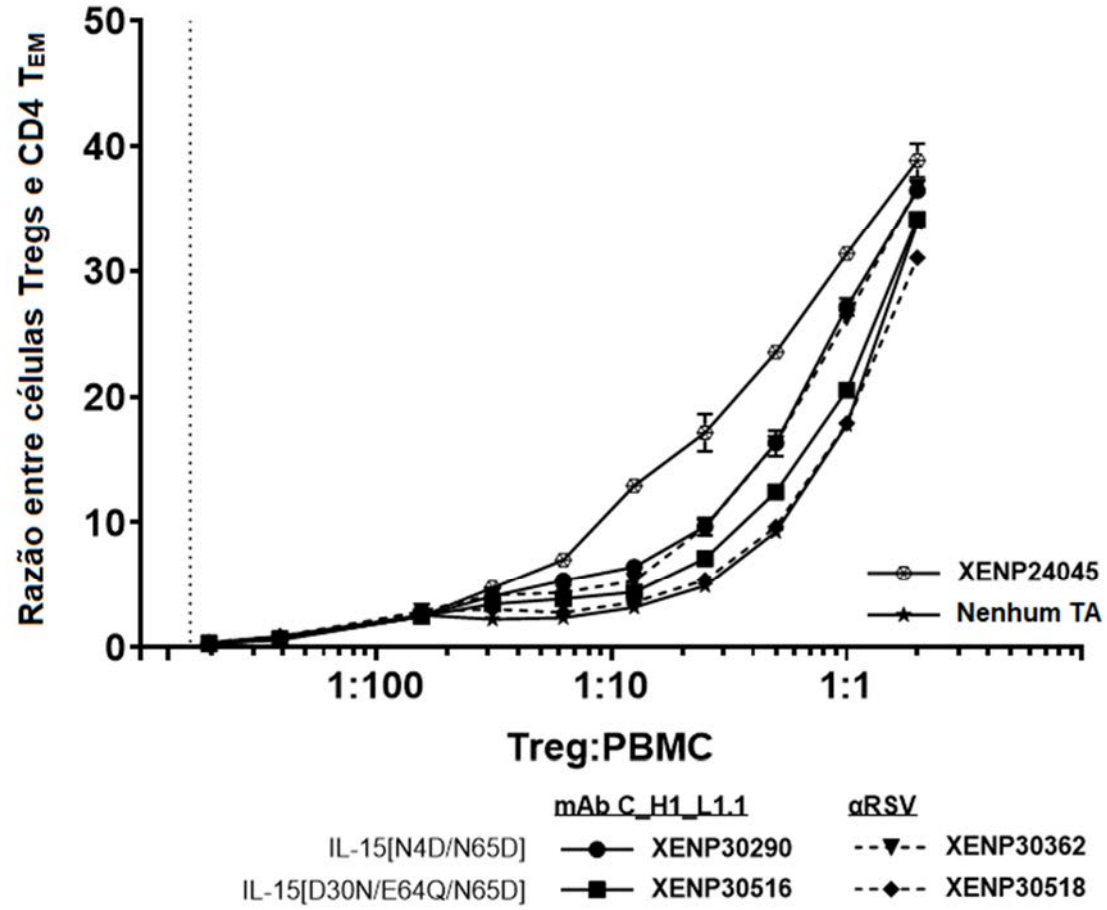

Razão entre células Tregs e CD4 TEM
50
40
30
20
10
0
1:100
1:10
1:1
Treg:PBMC
XENP24045
Nenhum TA
mAb C_H1_L1.1
αRSV
IL-15[N4D/N65D]
XENP30290
XENP30362
IL-15[D30N/E64Q/N65D]
XENP30516
XENP30518

Figura 124A

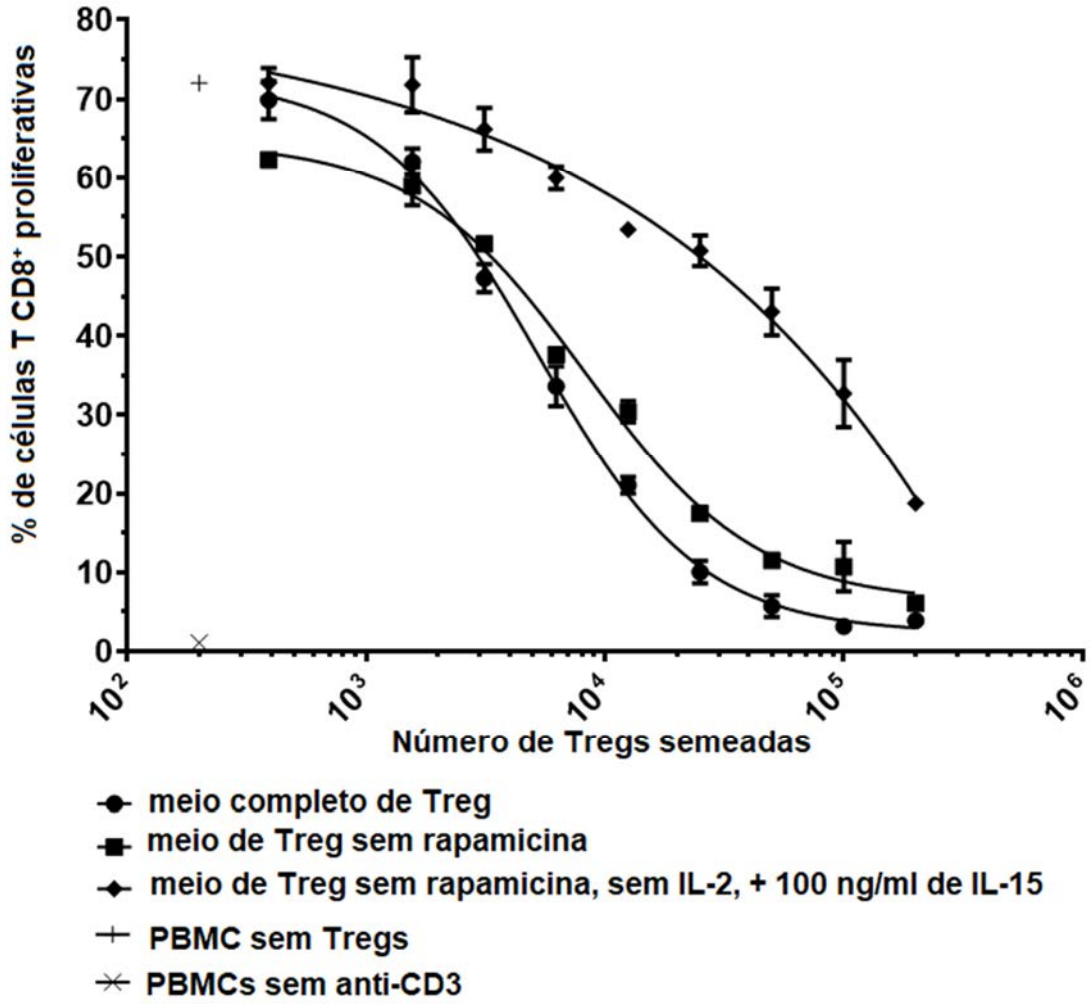

% de células T CD8+ proliferativas
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Número de Tregs semeadas
meio completo de Treg
meio de Treg sem rapamicina
meio de Treg sem rapamicina, sem IL-2, + 100 ng/ml de IL-15
PBMC sem Tregs
PBMCs sem anti-CD3

Figura 124B

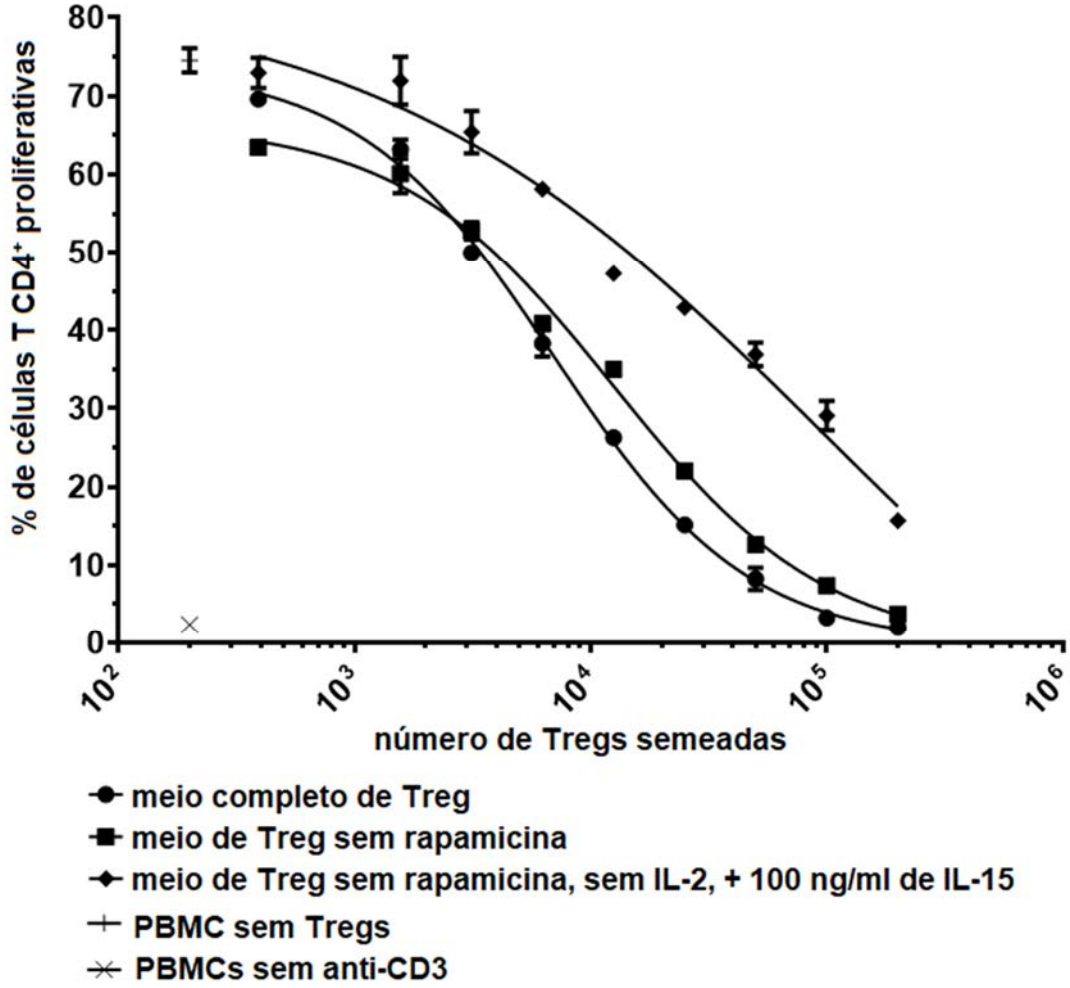

% de células T CD4+ proliferativas
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
número de Tregs semeadas
meio completo de Treg
meio de Treg sem rapamicina
meio de Treg sem rapamicina, sem IL-2, + 100 ng/ml de IL-15
PBMC sem Tregs
PBMCs sem anti-CD3

Figura 125A

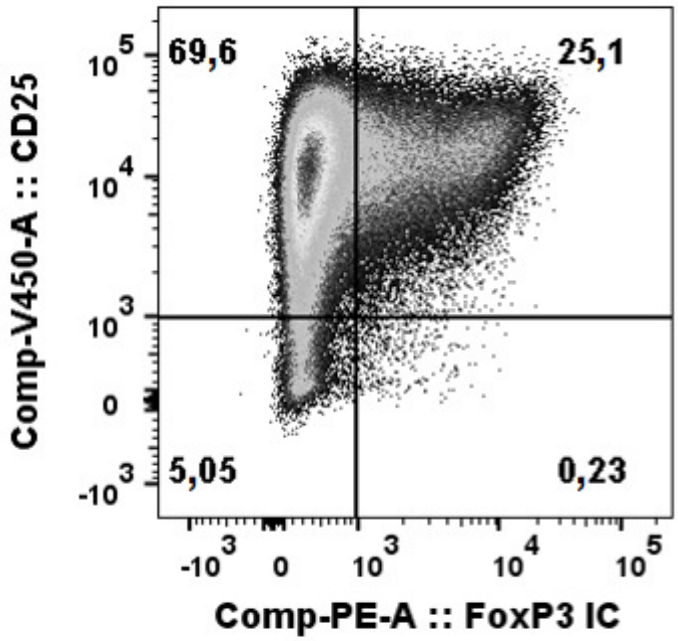


Figura 125B

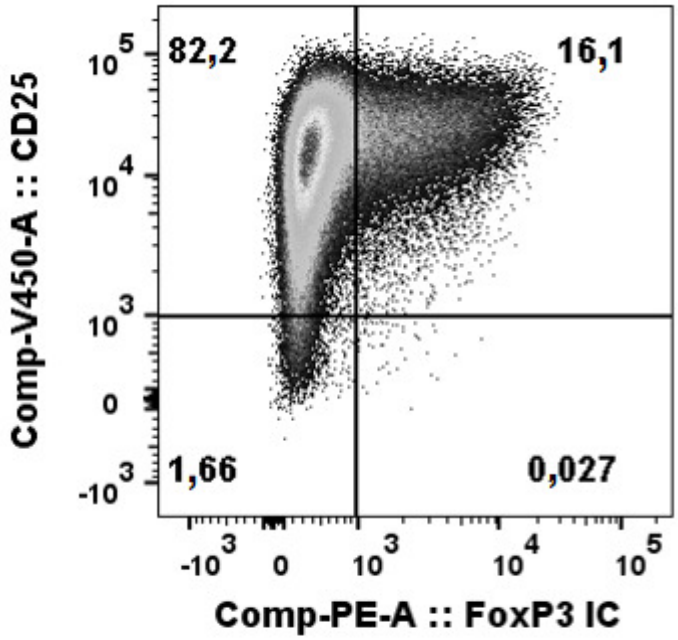


Figura 126A

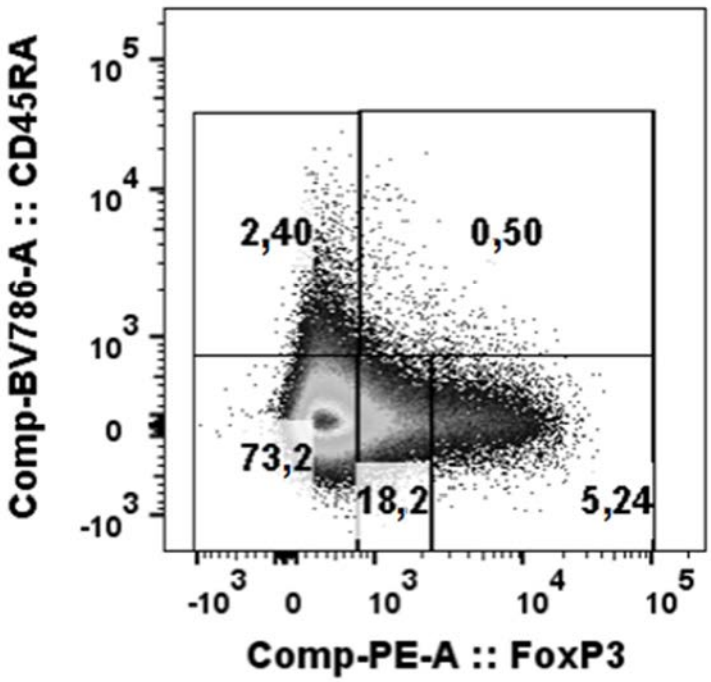


Figura 126B

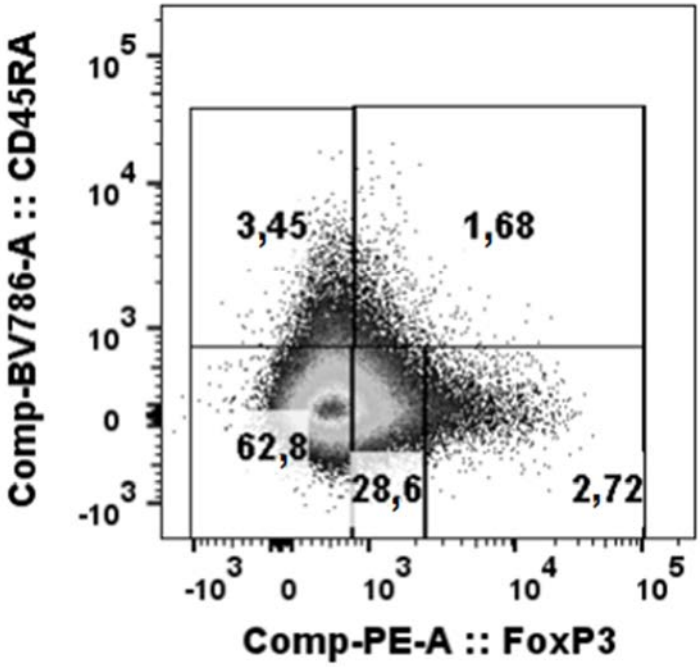


Figura 127A

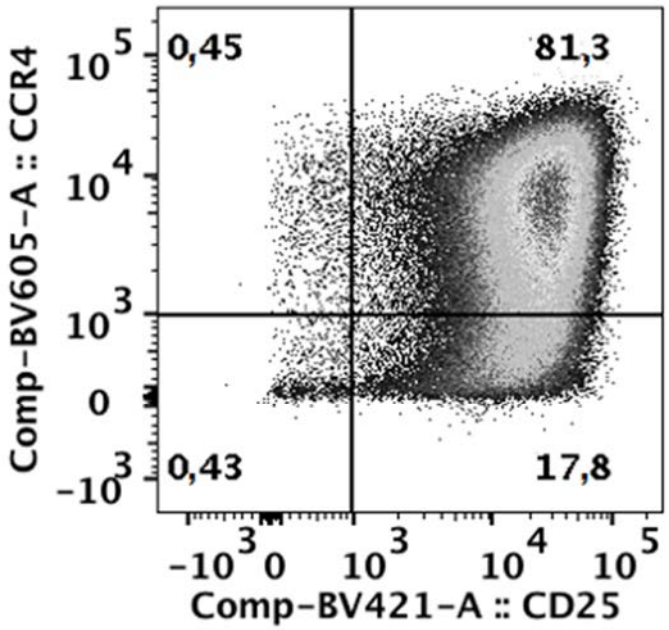


Figura 127B

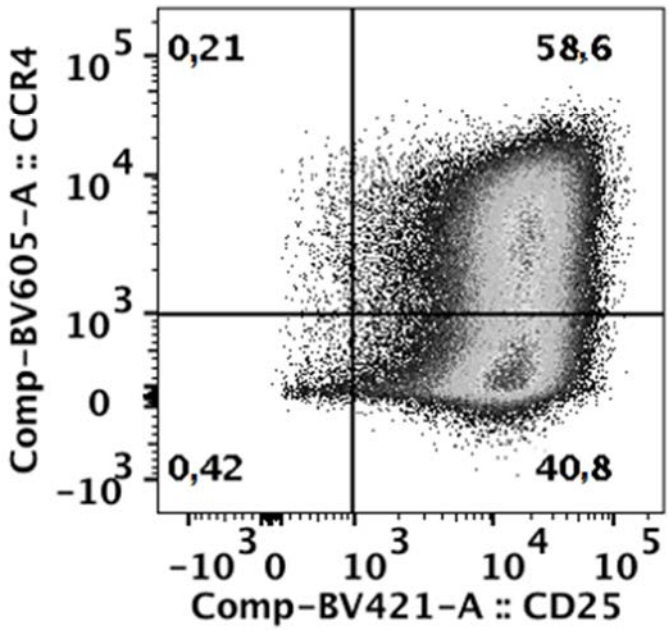


Figura 128A

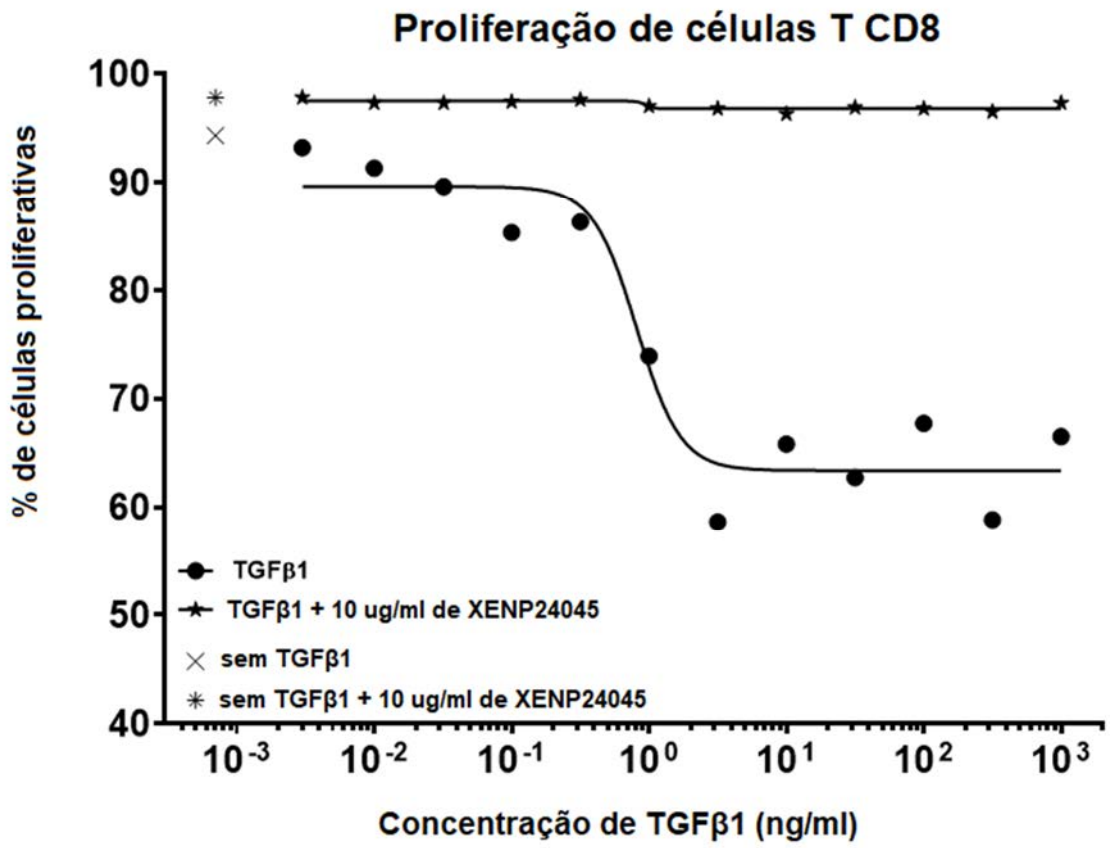
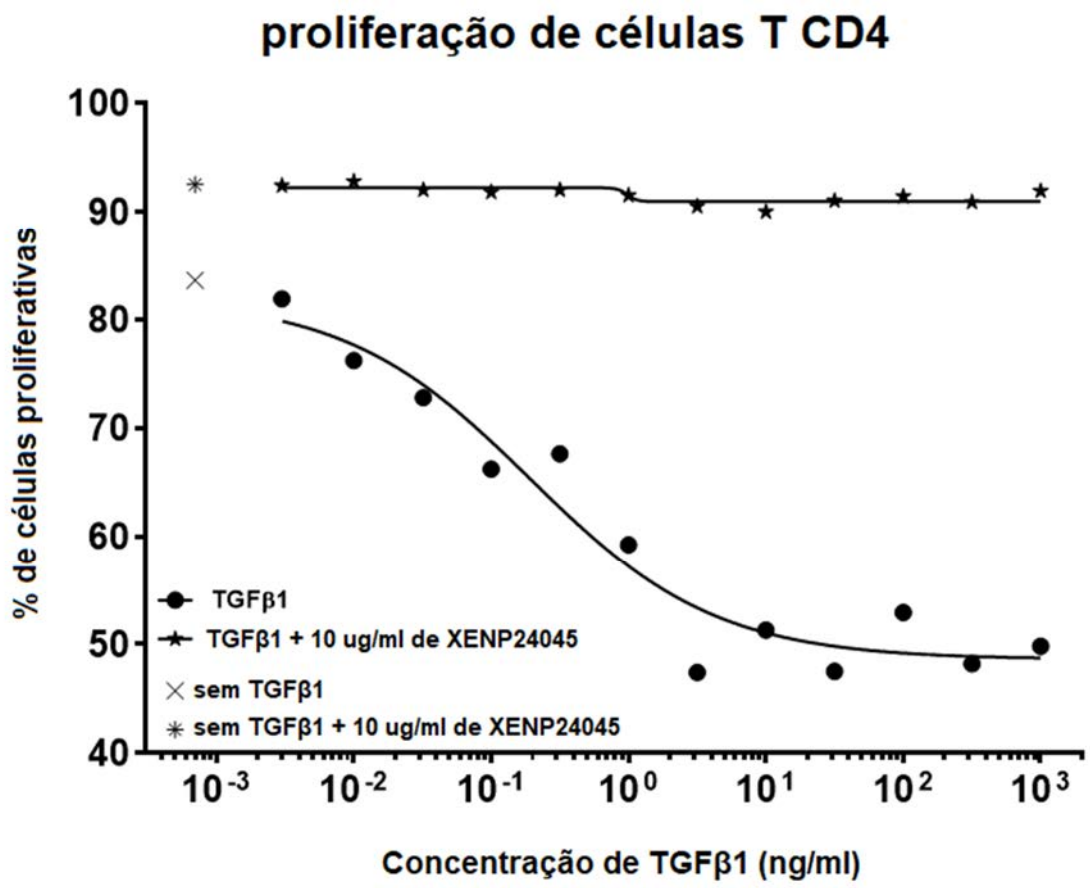

Proliferação de células T CD8
% de células proliferativas
100
90
80
70
60
50
40
TGFβ1
TGFβ1 + 10 ug/ml de XENP24045
sem TGFβ1
sem TGFβ1 + 10 ug/ml de XENP24045
10 -3
10 -2
10 -1
10 0
10 1
10 2
10 3
Concentração de TGFβ1 (ng/ml)

Figura 128B


proliferação de células T CD4
% de células proliferativas
100
90
80
70
60
50
40
TGFβ1
TGFβ1 + 10 ug/ml de XENP24045
sem TGFβ1
sem TGFβ1 + 10 ug/ml de XENP24045
10 -3
10 -2
10 -1
10 0
10 1
10 2
10 3
Concentração de TGFβ1 (ng/ml)

RESUMO

PROTEÍNA DE FUSÃO FC HETERODIMÉRICA DE IL-15/RA DIRECIONADA, COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, COMPOSIÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO FC HETERODIMÉRICA DE IL-15/RA DIRECIONADA E DE TRATAMENTO DE UM CÂNCER

A presente invenção se refere a proteínas de fusão Fc heterodiméricas direcionadas a PD-1 inovadoras que compreendem uma proteína de fusão Fc IL-15/IL-15Rα e uma proteína de fusão Fc de fragmento de anticorpo PD-1. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 são administradas a um paciente para tratar o câncer. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 são administradas em combinação com um anticorpo de bloqueio PD-1, como nivolumabe e/ou pembrolizumabe. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão IL-15/Rα-Fc direcionadas a PD-1 não competem com um anticorpo de bloqueio PD-1, como nivolumabe e/ou pembrolizumabe pela ligação ao antígeno.