



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

(21) BR 112020006115-8 A2



(22) Data do Depósito: 27/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2020

(54) Título: PROTEÍNAS DE FUSÃO IMUNOMODULADORAS

(51) Int. Cl.: C07K 19/00; C07K 14/715; A61K 38/16; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 27/09/2017 US 62/564,145.

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

(72) Inventor(es): CHRISTOPHER LARSON; TONY R. REID; BRYAN T. ORONSKY.

(86) Pedido PCT: PCT US2018053197 de 27/09/2018

(87) Publicação PCT: WO WO/2019/067770 de 04/04/2019

(85) Data da Fase Nacional: 26/03/2020

(57) Resumo: É fornecida uma proteína de fusão, por exemplo, uma proteína de fusão do receptor de citocina, por exemplo, um coletor de IL-10, com uma nova sequência de ligante para permitir que a proteína de fusão funcione de maneira ideal, por exemplo, para permitir que uma parte do receptor de citocina de uma proteína de fusão do receptor de citocina se ligue de maneira ideal à sua citocina alvo. A proteína de fusão, ou um vetor de expressão que codifica as proteínas de fusão, pode ser utilizado para tratar doenças e distúrbios proliferativos celulares, incluindo certas formas de câncer e distúrbios inflamatórios.

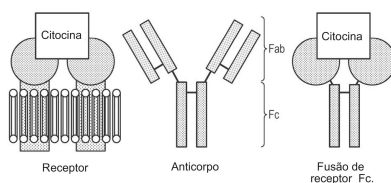


FIG. 1A

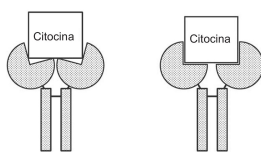


FIG. 1B

## Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROTEÍNAS DE FUSÃO IMUNOMODULADORAS"**.

### REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício e a prioridade ao pedido de patente provisório U.S. número de série 62/564.145, depositado em 27 de setembro de 2017, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

### CAMPO DE INVENÇÃO

[0002] O campo da invenção é a biologia molecular, especificamente imunologia e proteínas de fusão, por exemplo, proteínas de fusão do receptor de citocina.

### ANTECEDENTES

[0003] As citocinas são pequenas proteínas de sinalização celular secretadas que possuem uma ampla faixa de atividades, incluindo a regulação do crescimento celular e a diferenciação e modulação da função imune. Citocinas, receptores de citocina e certas outras proteínas imunomoduladoras têm sido utilizadas como terapêutica para tratar uma variedade de condições médicas. No entanto, a administração de tais proteínas, por exemplo, por vias subcutâneas ou vasculares, pode resultar em localização celular e extracelular inadequada, limitando assim a atividade terapêutica e/ou aumentando o risco de toxicidade.

[0004] A IL-10 é uma citocina homodimérica com propriedades imunorreguladoras produzidas pelas células, incluindo células Th2 ativadas, células B, queratinócitos, monócitos e macrófagos (Moore *et al.* (1993) ANNU. REV. IMMUNOL. 11:165). A IL-10 inibe a ativação e as funções efectoras de uma variedade de células incluindo as células T, monócitos e macrófagos. Em particular, a IL-10 inibe a síntese da citocina, incluindo a IL-1, IFN- $\gamma$  e TNF, através das células tais como células Th1, células exterminadoras naturais, monócitos e macrófagos (Fiorentino *et*

*al.* (1989) J. EXP. MED. 170:2081-2095; Fiorentino *et al.* (1991) J. IMMUNOL. 146:3444; Hsu *et al.* (1992) INT. IMMUNOL. 4:563; Hsu *et al.* (1992) INT. IMMUNOL. 4:563; D'Andrea *et al.* (1993) J. EXP. MED. 178:1041; de Waal Malefyt *et al.* (1991) J. EXP. MED. 174:915; Fiorentino *et al.* (1991) J. IMMUNOL. 147:3815). Vários patógenos, incluindo patógenos intracelulares, provocam a produção de IL-10 para retardar ou paralisar a remoção eficaz do patógeno pelo sistema imunológico (Moore *et al.* (1993) *supra*).

[0005] Apesar dos avanços que foram feitos até o momento no tratamento de distúrbios mediados pela IL-10, existe uma necessidade com relação a terapias aprimoradas para o tratamento de tais distúrbios.

#### SUMARIO DA INVENÇÃO

[0006] A invenção baseia-se, em parte, na descoberta de sequências ligantes que melhoram a função das proteínas de fusão, por exemplo, proteínas de fusão do receptor de citocina, por exemplo, proteínas de fusão do receptor de IL-10 (IL-10R), por exemplo, proteínas de fusão da subunidade alfa do receptor de IL-10 (IL-10RA), por exemplo, coletores de IL-10. As sequências ligantes podem permitir que uma parte da ligação ao ligante de uma proteína de fusão (por exemplo, um receptor de citocina) se ligue de maneira ideal a um ligante (por exemplo, uma citocina), fornecer a colocação espacial e temporal de dois ou mais componentes de uma proteína de fusão (por exemplo, duas subunidades de uma citocina dimérica), otimizar a expressão de um vetor de expressão (por exemplo, um vetor viral), reduzir a imunogenicidade ou fornecer um sítio de clivagem para levar em conta a liberação de um componente da proteína de fusão. Por exemplo, as sequências ligantes podem fornecer flexibilidade suficiente para permitir que um domínio de ligação ao ligante de um receptor de citocina adote uma conformação nativa no contexto de uma proteína de

fusão e minimizar a imunogenicidade potencial da proteína de fusão para uso como agente terapêutico.

[0007] Em um aspecto, a invenção fornece uma proteína de fusão isolada que compreende, por exemplo, em uma orientação de N- a C-terminal: uma primeira parte de um domínio extracelular, domínio da transmembrana ou domínio intracelular de uma citocina, receptor de citocina ou proteína imunomoduladora; um ligante de aminoácido; e pelo menos uma de uma segunda parte de um domínio extracelular, domínio da transmembrana ou domínio intracelular de uma citocina, receptor de citocina ou proteína imunomoduladora; uma região de dobradiça de imunoglobulina (Ig); e um domínio Fc de imunoglobulina (Ig). Em certas modalidades, o ligante compreende de cerca de 5 a cerca de 40 resíduos de aminoácido. Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende uma parte de um receptor de IL-10, por exemplo, um receptor de IL-10 humano, por exemplo, IL-10RA.

[0008] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de fusão isolada que compreende, em uma orientação N- a C-terminal: uma parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina; um ligante de aminoácido; uma região de dobradiça de imunoglobulina (Ig); e um domínio Fc de imunoglobulina (Ig); em que o ligante compreende de cerca de 5 a cerca de 40 resíduos de aminoácidos. Em certas modalidades, o receptor de citocina é um receptor de IL-10, por exemplo, um receptor de IL-10 humano, por exemplo, IL-10RA.

[0009] Em certas modalidades de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes, o ligante de aminoácido pode compreender, por exemplo, de cerca de 5 a cerca de 15, de cerca de 5 a cerca de 20, de cerca de 5 a cerca de 20, de cerca de 5 a cerca de 30, de cerca de 10 a cerca de 15, de cerca de 10 a cerca de 20, de cerca de 10 a cerca de 30, de cerca de 10 a cerca de 40, de cerca de 15 a cerca de 20, de cerca de 15 a cerca de 30 ou de cerca de 15 a cerca de 40 resíduos

de aminoácidos.

[0010] Em certas modalidades de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes, a sequência do ligante de aminoácido é derivada de uma proteína humana endógena, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, albumina ou caseína. Em certas modalidades, o ligante de aminoácido compreende uma parte C-terminal de um domínio CH1 de imunoglobulina (Ig), por exemplo, um domínio CHM de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE ou IgM. Em certas modalidades, o ligante de aminoácido compreende uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 e SEQ ID NO: 57. Em certas modalidades, o ligante de aminoácido compreende uma parte C-terminal de um domínio CH1 de IgG1, por exemplo, o ligante de aminoácido compreende uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 e SEQ ID NO: 57, por exemplo, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57.

[0011] Em certas modalidades de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes, o ligante de aminoácido compreende uma sequência derivada de uma citocina, molécula de sinalização, proteína ou peptídeo imunomodulador ou um peptídeo biologicamente ativo.

[0012] Em certas modalidades de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes, o ligante de aminoácido compreende um sítio de clivagem, por exemplo, um sítio de clivagem proteolítica, por exemplo, um sítio de clivagem proteolítico que é clivado por uma protease presente no retículo endoplasmático ou golgi de uma célula eucariótica. Em certas modalidades, o sítio de clivagem proteolítica é um sítio de clivagem de furina, por exemplo, um sítio de clivagem de furina compreendendo a sequência  $RX_1X_2R$  (SEQ ID NO: 50), em que  $X_1$  é qual-

quer aminoácido e  $X_2$  é Lys ou Arg, por exemplo, um sítio de clivagem de furina compreendendo a sequência RAKR (SEQ ID NO: 51). Em certas modalidades de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes, o ligante de aminoácido é proteoliticamente estável em um mamífero ou planta.

[0013] Em certas modalidades de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes, a parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina é uma parte solúvel de um domínio extracelular da IL-10R humana, por exemplo, IL-10RA. Por exemplo, em certas modalidades, a parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 12 ou os resíduos de aminoácido 22 a 229 da SEQ ID NO: 12.

[0014] Em certas modalidades de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes, a proteína de fusão compreende um ou mais de IL-10, TGF- $\beta$ , um receptor de TGF $\beta$ , por exemplo, o receptor de TGF $\beta$  tipo II (T $\beta$ RII), CD80, CD19, CD20, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12B/p40, IL-23A/p19, IL27A/p28, IL-27B/EBI3, IL-15, CD154, CD70, TNF-alta, CD86, CD137, CD137L, BORIS/CTCFL, FGF, ICAM, IL-24, GM-CSF, MAGE, NY-ESO-1, angiostatina, endostatina, acetilcolina, interferon-gama, DKK1/Wnt, p53, Ox40L, GM-CSF, uma proteína de fusão do receptor de IL-15, GITRL, CD40L, CD70, flagelina secretada, IL-12, timidina cinase, uma cadeia pesada ou cadeia leve de anticorpo anti-PD-1, uma cadeia pesada ou cadeia leve de anticorpo anti-PD-L1 e uma cadeia pesada ou cadeia leve de anticorpo anti-CTLA-4 ou um fragmento funcional destas.

[0015] Em certas modalidades de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes, a região de dobradiça de Ig é selecionada de uma região de dobradiça de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM, e o domínio Fc de Ig é selecionado dos domínios Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM. Em certas modali-

dades, a região de dobradiça e o domínio Fc de Ig juntos compreendem uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 e SEQ ID NO: 21. Em certas modalidades, o domínio Fc de Ig, a região de dobradiça de Ig e o domínio CH1 de Ig são derivados de uma única imunoglobulina.

[0016] Em certas modalidades de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 58. Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 58. Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 58.

[0017] Em certas modalidades de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácido tendo mais do que 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência selecionada de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO : 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 58.

[0018] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação a citocina dimérica compreendendo duas de qualquer uma das proteínas de fusão precedentes covalentemente ligadas entre si, em que cada proteína de fusão compreende um domínio extracelular de um receptor de citocina e em que os dois domínios extracelulares jun-

tos definem um sítio de ligação para uma citocina.

[0019] Em outro aspecto, a invenção fornece um ácido nucleico que compreende uma sequência nucleotídica que codifica qualquer uma das proteínas de fusão precedentes.

[0020] Em outro aspecto, a invenção fornece um vetor de expressão que compreende qualquer um dos ácidos nucleicos precedentes.

[0021] Em outro aspecto, a invenção fornece uma célula hospedeira que compreende qualquer um dos vetores de expressão precedentes. Em outro aspecto, a invenção fornece um método para produzir uma proteína de fusão que compreende o crescimento de uma célula hospedeira sob condições para expressar a proteína de fusão e purificar a proteína de fusão. Em outro aspecto, a invenção fornece um método para expressar uma proteína de fusão em uma célula alvo, compreendendo a exposição da célula a uma quantidade eficaz de qualquer um dos vetores de expressão precedentes. Em certas modalidades, a proteína de fusão é clivada pós-translacional em duas cadeias polipeptídicas.

[0022] Em outro aspecto, qualquer uma das proteínas de fusão ou vetores de expressão precedentes pode ser utilizada, por exemplo, para reduzir a atividade da citocina em um indivíduo, tratando assim várias indicações médicas que são mediadas por uma citocina, por exemplo, IL-10. Em outro aspecto, qualquer uma das proteínas de fusão ou vetores de expressão precedentes pode ser utilizada para inibir a proliferação de células tumorais *in vitro* e/ou *in vivo*, inibir o crescimento do tumor em um indivíduo com sua necessidade ou tratar o câncer em um indivíduo com sua necessidade. O indivíduo pode ser, por exemplo, um animal, por exemplo, um mamífero, por exemplo, um ser humano, por exemplo, um ser humano pediátrico. Por exemplo, quando administradas a um indivíduo humano com câncer, as proteínas de fusão ou os vetores de expressão inibem ou reduzem o cres-



cimento do tumor, ou reduzem a carga tumoral no indivíduo.

[0023] Em certas modalidades, o câncer pode ser selecionado de melanoma, carcinoma de células escamosas da pele, carcinoma basocelular, câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama, câncer anal, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas, mesotelioma, câncer de pulmão de pequenas células, carcinoma de células renais, câncer de próstata, câncer gastroesofágico, câncer colorretal, câncer testicular, câncer de bexiga, câncer de ovário, câncer de fígado, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, câncer de cérebro e sistema nervoso central, câncer de tireoide, câncer de paratireoide (por exemplo, carcinoma da paratireoide), câncer endometrial, câncer neuroendócrino, linfoma (por exemplo, Hodgkin e não Hodgkin), leucemia, carcinoma de células de Merkel, tumores estromais gastrointestinais, mieloma múltiplo, câncer uterino, um sarcoma, câncer renal, câncer ocular, câncer pancreático e um câncer de células germinativas (por exemplo, câncer de células germinativas do ovário). Em certas modalidades, o câncer pode ser selecionado de leucemia, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de endométrio, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer cervical, câncer de cérebro, câncer de pele, câncer colorretal, câncer de estômago, câncer de cabeça e pescoço e leucemia.

[0024] Em certas modalidades, a proteína de fusão ou o vetor de expressão é administrado em combinação com uma ou mais terapias selecionadas de cirurgia, radiação, quimioterapia, imunoterapia, terapia hormonal e viroterapia. Em certas modalidades, a proteína de fusão ou o vetor de expressão é administrado em combinação com um linfócito, por exemplo, uma célula T, por exemplo, uma célula T CAR.

[0025] Qualquer uma das proteínas de fusão ou vetores de expressão precedentes também pode ser utilizada para tratar uma condição inflamatória ou infecção em um indivíduo com sua necessidade.

[0026] Estes e outros aspectos e vantagens da invenção são ilustrados pelas seguintes figuras, descrição detalhada e reivindicações.

#### DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0027] A invenção pode ser mais completamente compreendida com referência aos seguintes desenhos.

[0028] A FIGURA 1A descreve um esquema de um receptor de citocina dimérico na superfície celular (esquerda), um anticorpo (meio) e uma fusão de receptor-Fc que se liga de maneira ideal a uma citocina alvo (direita). A FIGURA 1B representa uma fusão de receptor-Fc, por exemplo, um coletor de citocina, que é estericamente forçada a partir da ligação ideal a uma citocina alvo (esquerda), ou que adota uma configuração de ligação ideal (direita).

[0029] A FIGURA 2 representa um alinhamento de sequência das sequências de aminoácido dos domínios CH1 de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM humanos (parte superior) e domínios CH2 (parte inferior).

[0030] A FIGURA 3 representa um Western blot para Stat3 fosforilado após o tratamento de células repórteres com IL-10 e/ou as proteínas de fusão IL-10RA IL-10R-IgG e IL-10R-Fc, conforme indicado. Stat3 total foi utilizado como um controle de carga. A atividade da IL-10 foi marcadamente reduzida por IL-10R-IgG em comparação com IL-10R-Fc.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

[0031] A invenção fornece uma proteína de fusão recombinante para uso no tratamento de uma variedade de condições médicas, por exemplo, na inibição da proliferação de uma célula tumoral, inibição do crescimento tumoral, tratamento do câncer, tratamento de uma condição inflamatória ou tratamento de uma infecção, em um indivíduo. As proteínas de fusão exemplares compreendem: uma primeira parte de um domínio extracelular, domínio da transmembrana ou domínio intra-

celular de uma citocina, receptor de citocina ou proteína imunomoduladora; um ligante de aminoácido; e pelo menos uma de uma segunda parte de um domínio extracelular, domínio da transmembrana ou domínio intracelular de uma citocina, receptor de citocina ou proteína imunomoduladora; uma região de dobradiça de imunoglobulina (Ig); ou um domínio Fc de imunoglobulina (Ig). Está contemplado que a primeira e a segunda partes podem ser partes da mesma proteína ou partes de proteínas diferentes e, mesmo se a mesma proteína, a primeira e a segunda partes podem ser partes diferentes da mesma proteína. Em certas modalidades, o ligante compreende de cerca de 5 a cerca de 40 resíduos de aminoácido. As proteínas de fusão exemplares da invenção incluem coletores de citocina.

[0032] Um coletor de citocina, por exemplo, um coletor de IL-10, é uma molécula contendo uma parte solúvel do domínio extracelular de um receptor de citocina, por exemplo, um receptor de IL-10 (IL-10R), por exemplo, uma subunidade alfa do receptor de IL-10 (IL-10RA) projetada para ligar ou sequestrar uma citocina alvo. Em um coletor de citocina, o domínio extracelular de um receptor de citocina pode ser fundido a uma região de dobradiça de imunoglobulina (Ig) e domínio Fc de imunoglobulina (Ig) que pode levar em conta, por exemplo, o aumento da estabilidade, funções efectoras de Fc e/ou multimerização, por exemplo, dimerização. A dimerização proporcionada pela fusão a uma região de dobradiça de Ig e um domínio Fc de Ig é particularmente vantajosa para receptores de citocina que existem como complexos de receptor diméricos na superfície celular, tais como, por exemplo, T $\beta$ RII.

[0033] Os coletores de citocina convencionais, por exemplo, os coletores de IL-10, compreendem duas cadeias polipeptídicas, cada uma das cadeias polipeptídicas compreendendo uma parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina fundido a uma re-

gião de dobradiça de Ig e um domínio Fc de Ig. A parte solúvel do domínio extracelular do receptor de citocina é tipicamente fundida diretamente com a região de dobradiça de Ig, sem nenhuma sequência interveniente. As duas cadeias polipeptídicas estão ligadas covalentemente por ligações de dissulfeto entre resíduos de cisteína em cada uma das regiões de dobradiça de Ig. Cada cadeia polipeptídica fornece uma parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina, por exemplo, IL-10R, por exemplo, IL-10RA, e as duas partes solúveis de um domínio extracelular de um receptor de citocina definem entre si um sítio de ligação para uma citocina. Uma representação esquemática de um receptor de citocina dimérico, uma molécula de imunoglobulina (anticorpo) e uma proteína dimérica compreendendo duas proteínas de fusão ligadas covalentemente, cada uma compreendendo uma parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina fundido a uma região de dobradiça de Ig e um domínio Fc de Ig é representado na FIGURA 1A.

[0034] A invenção baseia-se, em parte, na descoberta de que os coletores de citocina convencionais compreendendo uma proteína de fusão de uma parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina para uma região de dobradiça de Ig e domínio Fc de Ig, por exemplo, coletores de IL-10, não se ligam de modo ideal à citocina alvo. Por exemplo, um coletor de IL-10 convencional não fornece flexibilidade suficiente entre os dois domínios de ligação de ligante de IL-10 para permitir que os dois domínios de ligação de ligante de IL-10 se reunam em uma configuração ideal para definir um sítio de ligação a IL-10.

[0035] Assim, em um aspecto, a invenção fornece uma proteína de fusão isolada que compreende, em uma orientação N- para C-terminal: uma parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina; um ligante de aminoácido; uma região de dobradiça de imuno-

globulina (Ig); e um domínio Fc de imunoglobulina (Ig); em que o ligante compreende de cerca de 5 a cerca de 40 resíduos de aminoácido. A sequência de ligante permite, por exemplo, que o domínio de ligação no domínio extracelular do receptor de citocina se ligue de maneira ideal à sua citocina alvo. Isto é especialmente importante quando a proteína de ligação a citocina for um dímero que compreende duas das proteínas de fusão precedentes que juntas definem um sítio de ligação para ligar a citocina alvo. Sem o ligante, os dois domínios de ligação podem ser estericamente impedidos de formar o sítio de ligação ideal (FIGURA 1B). Várias características e aspectos da invenção são debatidos com maiores detalhes abaixo.

### I. Proteínas de Fusão

[0036] As proteínas de fusão exemplares podem compreender: uma primeira parte de um domínio extracelular, domínio da transmembrana ou domínio intracelular de uma citocina, receptor de citocina ou proteína imunomoduladora; um ligante de aminoácido; e pelo menos uma de uma segunda parte de um domínio extracelular, domínio da transmembrana ou domínio intracelular de uma citocina, receptor de citocina ou proteína imunomoduladora; uma região de dobradiça de imunoglobulina (Ig); e um domínio Fc de imunoglobulina (Ig). Por exemplo, uma proteína de fusão divulgada pode compreender, em uma orientação N- para C-terminal: uma parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina; um ligante de aminoácido; uma região de dobradiça de imunoglobulina (Ig); e um domínio Fc de imunoglobulina (Ig); em que o ligante compreende de cerca de 5 a cerca de 40 resíduos de aminoácidos.

[0037] As citocinas exemplares incluem IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, GM-CSF, IL-6, IL-11, G-CSF, IL-12, LIF, OSM, IL-10, IL-20, IL-14, IL-16, IL-17, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CD154, LT- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , 4-1BBL APRIL, CD70, CD153, CD178,

GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, Epo, Tpo, Flt-3L, SCF, M-CSF e MSP.

[0038] Como aqui utilizado, uma proteína "imunomoduladora" refere-se a uma proteína que modula a função do sistema imunológico de um indivíduo. As proteínas imunomoduladoras podem, por exemplo, modular a função de, por exemplo, células B, células T e/ou a produção de anticorpos. As proteínas imunomoduladoras exemplares incluem inibidores do ponto de verificação. As proteínas imunomoduladoras exemplares podem incluir, por exemplo, CTLA-4, CD70, IL-2, CD40L, OX40L, IL-12, IL-7, PD-1 ou PD-L1, ou qualquer proteína que module a sua atividade. Outras proteínas imunomoduladoras exemplares podem incluir um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1.

[0039] Como aqui utilizado, uma "parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina" refere-se a qualquer domínio extracelular de um receptor de citocina ou fragmento de um domínio extracelular de um receptor de citocina que é capaz de se ligar a uma citocina alvo. Entende-se que a parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina também contempla as partes do domínio extracelular que compreendem um domínio de ligação que, isoladamente ou em combinação com um segundo domínio de ligação (por exemplo, no caso de proteínas de fusão diméricas), é capaz de se ligar a uma citocina alvo.

[0040] Os receptores de citocina exemplares incluem receptores de citocina do tipo I (por exemplo, receptores de GM-CSF, receptores de G-CSF, receptores de IL tipo I, receptores de Epo, receptores de LIF, receptores de CNTF ou receptores de TPO), receptores de citocina do tipo II (por exemplo, receptores de IL-10, receptores de IFN-alfa (por exemplo, IFNAR1 ou IFNAR2), receptores de IFN-beta, receptores de IFN-gama (por exemplo, IFNGR1 ou IFNGR2), receptores de quimiocina (por exemplo, receptores de quimiocina CC, receptores de quimiocina

CXC, receptores de quimiocina CX3C ou receptores de quimiocina XC), receptores da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFRs; por exemplo, TNFRSF5/CD40, TNFRSF8/CD30, TNFRSF7/CD27, TNFRSF1A/TNFR1/CD120a ou TNFRSF1B/TNFR2/CD120b), receptores da superfamília de TGF $\beta$  (por exemplo, receptor do tipo I de TGF $\beta$  ou receptor do tipo II de TGF $\beta$ ) ou receptores da superfamília de imunoglobulina (Ig) (por exemplo, receptores de interleucina-1, CSF-1R, PDGFR (por exemplo, PDGFRA ou PDGFRB) ou SCFR). Os receptores de citocina preferidos incluem receptores de citocina diméricos, por exemplo, receptores da superfamília de TGF $\beta$ , por exemplo, o receptor de TGF $\beta$  do tipo II humano (T $\beta$ RII). Em certas modalidades, a parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina é uma parte solúvel de um domínio extracelular da IL-10R humana, por exemplo, IL-10RA humana, por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 12, ou uma sequência de aminoácido tendo mais do que 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 12 e/ou seu fragmento que compreende um domínio de ligação que se liga à IL-10.

[0041] A parte solúvel do domínio extracelular de um receptor de citocina mantém sua capacidade de se ligar ao seu ligante nativo. Em certas modalidades, a parte solúvel do domínio extracelular retém pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% da atividade de ligação ao seu ligante nativo quando comparado com o receptor de citocina de comprimento total.

[0042] Em certas modalidades, a proteína de fusão pode compreender, por exemplo, um ou mais de T $\beta$ RII, TGF- $\beta$ , CD80, CD19, CD20, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12B/p40, IL-23A/p19, IL-27A/p28, IL-27B/EBI3, IL-15, CD154, CD70, TNF-alfa, CD86, CD137, CD137L, BORIS/CTCFL, FGF, ICAM, IL-24, GM-CSF, MAGE, NY-ESO-1, angiostatina, endostatina, acetilcolina, interferon-gama,



DKK1/Wnt, p53, Ox40L, GM-CSF, uma proteína de fusão do receptor de IL-15, GITRL, CD40L, CD70, flagelina secretada, IL-12, timidina cinase, uma cadeia pesada ou cadeia leve de anticorpo anti-PD-1, uma cadeia pesada ou cadeia leve de anticorpo anti-PD-L1 e uma cadeia pesada ou cadeia leve de anticorpo anti-CTLA-4, ou seu fragmento funcional.

[0043] Como utilizado nesta invenção, o termo "região de dobradiça de imunoglobulina (Ig)" refere-se à sequência de aminoácidos que tipicamente conecta os domínios CH1 e CH2 de uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina. Uma região de dobradiça de Ig pode incluir, por exemplo, um ou mais resíduos de cisteína capazes de formar ligações de dissulfeto com resíduos de cisteína em outra cadeia de proteína. Como aqui utilizado, o termo "domínio Fc de imunoglobulina (Ig)" refere-se a um fragmento de uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina que é capaz de se ligar a um receptor Fc. Um domínio Fc de Ig pode incluir, por exemplo, um domínio CH2 e CH3 de imunoglobulina (Ig). Os limites entre os domínios CH1, CH2 e CH3 de Ig são bem conhecidos na técnica e podem ser encontrados, por exemplo, no banco de dados PROSITE (disponível na Internet em [prosite.expasy.org](http://prosite.expasy.org)). Para maior clareza, os alinhamentos das sequências de aminoácido dos domínios CH1 e CH2 de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM humanos são fornecidos na FIGURA 2.

[0044] Em certas modalidades, a região de dobradiça de Ig é selecionada de uma região de dobradiça de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM, e o domínio Fc de Ig é selecionado de um domínio Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM. Em certas modalidades, a região de dobradiça e o domínio Fc de Ig juntos compreendem uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 e SEQ ID NO: 21.



Em certas modalidades, a região de dobradiça e o domínio Fc de Ig juntos compreendem uma sequência de aminoácidos tendo mais do que 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com uma sequência selecionada das SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 e SEQ ID NO: 21.

[0045] O ligante de aminoácido pode permitir que uma parte de ligação ao ligante de uma proteína de fusão (por exemplo, um receptor de citocina) se ligue de maneira ideal a um ligante (por exemplo, uma citocina), forneça co-localização temporal e espacial de dois ou mais componentes de uma proteína de fusão (por exemplo, duas subunidades de uma citocina dimérica), otimize a expressão de um vetor de expressão (por exemplo, um vetor viral), reduza a imunogenicidade ou forneça um sítio de clivagem para levar em conta a liberação de um componente da proteína de fusão.

[0046] O ligante de aminoácido pode compreender, por exemplo, de cerca de 5 a cerca de 15, de cerca de 5 a cerca de 20, de cerca de 5 a cerca de 25, de cerca de 5 a cerca de 30, de cerca de 5 a cerca de 35, de cerca de 5 a cerca de 40, de cerca de 10 a cerca de 15, de cerca de 10 a cerca de 20, de cerca de 10 a cerca de 25, de cerca de 10 a cerca de 30, de cerca de 10 a cerca de 35, de cerca de 10 a cerca de 40, de cerca de 15 a cerca de 20, de cerca de 15 a cerca de 25, de cerca de 15 a cerca de 30, de cerca de 15 a cerca de 35 ou de cerca de 15 a cerca de 40 resíduos de aminoácidos. Os aminoácidos no ligante podem ser aminoácidos de ocorrência natural ou aminoácidos modificados.

[0047] Em certas modalidades, a sequência de ligante de aminoácidos é derivada de uma proteína humana endógena, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, albumina ou caseína. Em certas modalidades, o ligante de aminoácido compreende uma

parte C-terminal, por exemplo, de cerca de 5 a cerca de 40 aminoácidos, de um domínio CH1 de imunoglobulina (Ig), por exemplo, um domínio CH1 de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE ou IgM. Em certas modalidades, o ligante de aminoácido compreende uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 e SEQ ID NO: 64. Em certas modalidades, o ligante de aminoácido compreende uma sequência tendo mais do que 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 e SEQ ID NO: 64.

[0048] Uma proteína ou polipeptídeo é "derivada de" uma proteína ou polipeptídeo de referência se compreender uma sequência de aminoácido que é substancialmente semelhante a toda ou uma parte correspondente da sequência de aminoácidos do tipo selvagem da proteína ou polipeptídeo de referência. Em certas modalidades, uma proteína ou polipeptídeo que é derivada de uma proteína ou polipeptídeo do tipo selvagem pode ter uma ou mais substituições de aminoácidos em relação à proteína ou polipeptídeo do tipo selvagem. Por exemplo, contempla-se que uma proteína ou polipeptídeo que é derivada de uma proteína ou polipeptídeo do tipo selvagem possa ter mais do que 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a proteína ou polipeptídeo de tipo selvagem. Além disso, é contemplado que uma proteína ou polipeptídeo que é

derivada de uma proteína ou polipeptídeo do tipo selvagem pode conter substituições mais conservadoras em relação à proteína ou polipeptídeo do tipo selvagem. Como aqui utilizado, o termo "substituição conservadora" refere-se a uma substituição com um aminoácido estruturalmente semelhante. Por exemplo, substituições conservadoras podem incluir aquelas dentro dos seguintes grupos: Ser e Cys; Leu, Ile, e Val; Glu e Asp; Lys e Arg; Phe, Tyr, e Trp; e Gln, Asn, Glu, Asp, e His. As substituições conservadoras também podem ser definidas pelo algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), a matriz de substituição BLOSUM (por exemplo, matriz BLOSUM 62) ou a matriz PAM de substituição:p (por exemplo, a matriz PAM 250).

[0049] Em certas modalidades, a sequência de ligante de aminoácido é derivada de uma citocina, molécula de sinalização, proteína ou peptídeo imunomodulador ou um peptídeo biologicamente ativo.

[0050] Outras sequências de ligante contempladas incluem ligantes ricos em glicina e serina, por exemplo, (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 49). Sequências de ligante exemplares adicionais são divulgadas, por exemplo, em George *et al.* (2003) PROTEIN ENGINEERING 15:871–879 e Patentes U.S. Nos. 5.482.858 e 5.525.491.

[0051] Em certas modalidades, o ligante de aminoácido pode compreender um sítio de clivagem, por exemplo, um sítio de clivagem proteolítico ou não proteolítico. Em certas modalidades, o sítio de clivagem proteolítica é clivado por uma protease presente em um tecido, organela ou compartimento intracelular específico. Em certas modalidades, o ligante compreende um sítio de clivagem proteolítica e dois resíduos de cisteína que resultam em uma ligação de dissulfeto após a clivagem proteolítica. Em certas modalidades, o sítio de clivagem proteolítica é clivado por uma protease selecionada de uma metaloproteínase matriz (MMP), furina, PC1, PC2, PC3, catepsina B, proteinase 3 e caspase 3. Em certas modalidades, o sítio de clivagem é um sítio de

clivagem proteolítica que é clivado por uma protease que está presente no retículo endoplasmático ou golgi de uma célula eucariótica. Em certas modalidades, o sítio de clivagem proteolítica é um sítio de clivagem de furina. A furina é uma protease que está de modo onipresente expressa e está localizada no golgi, onde reconhece a sequência de consenso  $RX_1X_2R$  (SEQ ID NO: 50), em que  $X_1$  é qualquer aminoácido e  $X_2$  é Lys ou Arg, e cliva após a Arg final. A furina desempenha um papel biológico na clivagem de pró-peptídeos de proteínas que são trafegadas através dos golgi. Em conformidade, em certas modalidades o sítio de clivagem proteolítica é um sítio de clivagem de furina que compreende a sequência  $RX_1X_2R$  (SEQ ID NO: 50), em que  $X_1$  é qualquer aminoácido e  $X_2$  é Lys ou Arg, por exemplo, um sítio de clivagem de furina compreendendo a sequência RAKR (SEQ ID NO: 51).

[0052] Em certas modalidades, o Fc de Ig, a região de dobradiça de Ig e o domínio CH1 de Ig são derivados de uma única imunoglobulina.

[0053] Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 58. Em certas modalidades, uma proteína de fusão divulgada compreende uma sequência de aminoácido tendo mais do que 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência selecionada de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 58.

[0054] A identidade da sequência pode ser determinada de várias

maneiras que estão dentro da habilidade na técnica, por exemplo, utilizando software de computador disponível ao público tal como o software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). A análise BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizando o algoritmo empregado pelos programas blastp, blastn, blastx, tblastn e tblastx (Karlin *et al.*, (1990) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 87:2264-2268; Altschul, (1993) J. MOL. EVOL. 36, 290-300; Altschul *et al.*, (1997) NUCLEIC ACIDS RES. 25:3389-3402, incorporado por referência) é adaptada para pesquisa de similaridade de sequência. Para um exame de questões básicas na pesquisa de bancos de dados de sequência, ver Altschul *et al.*, (1994) NATURE GENETICS 6:119-129, que é totalmente incorporado por referência. Aqueles versados na técnica podem determinar os parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para alcançar o alinhamento máximo ao longo de todo o comprimento das sequências sendo comparadas. Os parâmetros de pesquisa para histograma, descrições, alinhamentos, expectativa (isto é, o limite de significância estatística para relatórios correspondentes contra as sequências de banco de dados), ponto de corte, matriz e filtro estão nas configurações padrão. A matriz de pontuação padrão utilizada por blastp, blastx, tblastn e tblastx é a matriz BLOSUM62 (Henikoff *et al.*, (1992) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 89:10915-10919, totalmente incorporado por referência). Quatro parâmetros blastn podem ser ajustados como se segue: Q = 10 (penalidade de criação da abertura); R = 10 (penalidade de extensão da abertura); wink = 1 (gera ocorrências de palavras em todas as posições wink.sup.th da consulta); e gapw = 16 (define a largura da janela na qual os alinhamentos de abertura são gerados). As configurações equivalentes dos parâmetros Blastp podem ser Q = 9; R = 2; wink = 1; e gapw = 32. As pesquisas também podem ser conduzidas utilizando o parâmetro NCBI (National Center for Biotechnology Information)

BLAST Advanced Option (por exemplo: -G, Custo para abrir o espaço [Inteiro]: padrão = 5 para nucleotídeos/11 para proteínas; -E, Custo para estender o espaço [Inteiro]: padrão = 2 para nucleotídeos/1 para proteínas; -q, Penalidade por incompatibilidade de nucleotídeo [Inteiro]: padrão = -3; -r, recompensa por correspondência de nucleotídeo [Inteiro]: padrão = 1; -e, valor esperado [Real]: padrão = 10; -W, tamanho das palavras [Inteiro]: padrão = 11 para nucleotídeos / 28 para megablast / 3 para proteínas; -y, Dropoff (X) para extensões blast em bits: padrão = 20 para blastn / 7 para outros; -X, valor de dropoff X para alinhamento de abertura (em bits): padrão = 15 para todos os programas, não aplicável ao blastn; e -Z, valor final de dropoff X para alinhamento de abertura (em bits): 50 para blastn, 25 para os outros). O ClustalW para alinhamentos de proteínas aos pares também pode ser utilizado (os parâmetros padrão podem incluir, por exemplo, matriz Blosun62 e penalidade de extensão de abertura = 10 e penalidade de extensão de abertura = 0,1). Uma comparação Bestfit entre as sequências, disponível no pacote GCG versão 10.0, utiliza os parâmetros de DNA GAP = 50 (penalidade de criação de abertura) e LEN = 3 (penalidade de extensão de abertura) e as configurações equivalentes nas comparações de proteínas são GAP = 8 e LEN = 2.

[0055] Em um aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação a citocina compreendendo duas proteínas de fusão, em que cada proteína de fusão compreende em uma orientação N- a C-terminal: uma parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina; um ligante de aminoácido; uma região de dobradiça de imunoglobulina (Ig); e um domínio Fc de imunoglobulina (Ig); em que o ligante compreende de cerca de 5 a cerca de 40 resíduos de aminoácido, em que as duas proteínas de fusão são covalentemente ligadas entre si e em que os dois domínios extracelulares juntos definem um sítio de ligação para uma citocina.

[0056] A proteína de ligação a citocina pode compreender duas das proteínas de fusão precedentes covalentemente ligadas entre si, em que cada proteína de fusão compreende um domínio extracelular de um receptor de citocina e em que os dois domínios extracelulares juntos definem um sítio de ligação para uma citocina. As proteínas de fusão podem ser ligadas covalentemente, por exemplo, através de ligações de dissulfeto entre os resíduos de cisteína na região de dobradiça de Ig de cada proteína de fusão. Em certas modalidades, as proteínas de fusão, monoméricas ou multiméricas (por exemplo, diméricas) retêm pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% da atividade de ligação do ligante alvo quando comparadas com o receptor nativo de citocina de comprimento total.

[0057] Em certas modalidades, uma proteína de ligação a citocina da invenção liga uma citocina com uma  $K_D$  de 200 nM, 100 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 50 pM, 25 pM ou mais baixa. Em certas modalidades, uma proteína de ligação a citocina da invenção liga uma citocina com uma  $K_D$  de 200 nM a 100 nM, de 200 nM a 20 nM, de 200 nM a 10 nM, de 200 nM a 5 nM, de 200 nM a 1 nM, de 200 nM a 50 pM, de 200 nM a 25 pM, de 100 nM a 20 nM, de 100 nM a 10 nM, de 100 nM a 5 nM, de 100 nM a 1 nM, de 100 nM a 50 pM, de 100 nM a 25 pM, de 20 nM a 10 nM, de 20 nM a 5 nM, de 20 nM a 1 nM, de 20 nM a 50 pM, de 20 nM a 25 pM, de 10 nM a 5 nM, de 10 nM a 1 nM, de 10 nM a 50 pM, de 10 nM a 25 pM, de 5 nM a 1 nM, de 5 nM a 50 pM, de 5 nM a 25 pM, de 1 nM a 50 pM, de 1 nM a 25 pM ou de 50 pM a 25 pM. Em certas modalidades, uma proteína de ligação a citocina da invenção liga a IL-10 com uma  $K_D$  de 200 nM, 100 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 50 pM, 25 pM ou mais baixa. Em certas modalidades, uma proteína de ligação a citocina da invenção liga a IL-10 com uma  $K_D$  de 200 nM a 100 nM, de 200 nM a 20 nM, de



200 nM a 10 nM, de 200 nM a 5 nM, de 200 nM a 1 nM, de 200 nM a 50 pM, de 200 nM a 25 pM, de 100 nM a 20 nM, de 100 nM a 10 nM, de 100 nM a 5 nM, de 100 nM a 1 nM, de 100 nM a 50 pM, de 100 nM a 25 pM, 20 nM a 10 nM, de 20 nM a 5 nM, de 20 nM a 1 nM, de 20 nM a 50 pM, de 20 nM a 25 pM, de 10 nM a 5 nM, de 10 nM a 1 nM, de 10 nM a 50 pM, de 10 nM a 25 pM, de 5 nM a 1 nM, de 5 nM a 50 pM, de 5 nM a 25 pM, de 1 nM a 50 pM, de 1 nM a 25 pM, ou de 50 pM a 25 pM. Os valores de  $K_D$  podem ser determinados por métodos bem conhecidos na técnica, incluindo ressonância de plásmon superficial ou métodos de interferometria de biocamada.

[0058] As proteínas de fusão exemplares da invenção incluem proteínas que compreendem uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 58. Para maior clareza, as sequências dos elementos individuais dessas proteínas e as proteínas das quais as sequências dos elementos individuais foram derivadas, incluindo a parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de citocina, o ligante de aminoácido, a região de dobradiça de Ig e o domínio Fc de Ig, são apresentadas na TABELA 1.



TABELA 1

<b>Proteína</b>	<b>Fonte do Receptor SEQ ID do Receptor</b>	<b>Fonte do Ligante SEQ ID do Ligante</b>	<b>Fonte da Dobradiça de Ig / Fonte Fc de Ig SEQ ID da Dobradiça de Ig / Fc de Ig</b>
SEQ ID NO: 22	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgG1 SEQ ID NO: 1	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 55	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgG1 SEQ ID NO: 53	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 56	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgG1 SEQ ID NO: 54	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 58	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgG1 SEQ ID NO: 57	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 23	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgG2 SEQ ID NO: 2	IgG2 SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 24	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgG3 SEQ ID NO: 3	IgG3 SEQ ID NO: 15
SEQ ID NO: 25	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgG4 SEQ ID NO: 4	IgG4 SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 26	IL-10RA	domínio CH1 de IgA1	IgA1

<b>Proteína</b>	<b>Fonte do Receptor SEQ ID do Receptor</b>	<b>Fonte do Ligante SEQ ID do Ligante</b>	<b>Fonte da Dobradiça de Ig / Fonte Fc de Ig SEQ ID da Dobradiça de Ig / Fc de Ig</b>
	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO: 27	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgA2 SEQ ID NO: 6	IgA2 SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 28	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgD SEQ ID NO: 7	IgD SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 29	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgE SEQ ID NO: 8	IgE SEQ ID NO: 20
SEQ ID NO: 30	IL-10RA SEQ ID NO: 12	domínio CH1 de IgM SEQ ID NO: 9	IgM SEQ ID NO: 21
SEQ ID NO: 31	IL-10RA SEQ ID NO: 12	Albumina SEQ ID NO: 10	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 32	IL-10RA SEQ ID NO: 12	Caseína SEQ ID NO: 11	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 33	mIL-10RA SEQ ID NO: 34	domínio CH1 de mIgG1 SEQ ID NO: 35	mIgG1 SEQ ID NO: 36

TABELA 2

<b>Sequência de Proteína</b>	<b>Sequência de Ácido Nucleico</b>
SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 37
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 39
SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 40
SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 41
SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 42
SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 43
SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 44
SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 45
SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 46
SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 47

## II. Produção da proteína de fusão

[0059] Os métodos para a produção de proteínas de fusão da invenção são conhecidos na técnica. Por exemplo, as moléculas de DNA que codificam uma proteína de fusão divulgada podem ser quimicamente sintetizadas utilizando as informações de sequência aqui fornecidas. Moléculas de DNA sintético podem ser ligadas a outras sequências de nucleotídeo apropriadas, incluindo, por exemplo, sequências de controle de expressão, para produzir construções convencionais de expressão gênica que codificam a proteína de fusão desejada. A produção de construções genéticas definidas está dentro da rotina de habilidade na técnica. Sequências de ácido nucleico exemplares SEQ ID NOs: 37 a 47, que codificam as proteínas de fusão das SEQ ID NOs: 22 a 32, podem ser observadas na TABELA 2.

[0060] Os ácidos nucleicos que codificam as proteínas de fusão desejadas podem ser incorporados (ligados) a vetores de expressão, que podem ser introduzidos nas células hospedeiras através de técnicas convencionais de transfecção ou transformação. Células hospe-

deiras exemplares são células de *E. coli*, células de ovário de hamster chinês (CHO), células HeLa, células renais de hamster bebê (BHK), células renais de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2) e células de mieloma. As células hospedeiras transformadas podem ser cultivadas sob condições que permitem que as células hospedeiras expressem os genes que codificam a proteína de fusão desejada.

[0061] As condições específicas de expressão e purificação variam dependendo do sistema de expressão empregado. Por exemplo, se um gene deve ser expresso em *E. coli*, ele é em primeiro lugar clonado em um vetor de expressão através do posicionamento do gene planejado a jusante de um promotor bacteriano adequado, por exemplo, Trp ou Tac, e uma sequência de sinal procariótica. A proteína segregada expressa se acumula nos corpos refratários ou de inclusão e pode ser colhida após a ruptura das células por prensa francesa ou aplicação de energia sonora. Os corpos refratários são então solubilizados, e as proteínas redobradas e clivadas por métodos conhecidos na técnica.

[0062] Se o gene planejado deve ser expresso em células hospedeiras eucarióticas, por exemplo, células de CHO, ele é em primeiro lugar inserido em um vetor de expressão contendo um promotor eucariótico adequado, um sinal de secreção, uma sequência poli A e um códon de parada, e, opcionalmente, pode conter intensificadores e vários íntrons. A construção do gene pode ser introduzida nas células hospedeiras eucarióticas utilizando técnicas convencionais.

[0063] Um polipeptídeo compreendendo uma proteína de fusão divulgada pode ser produzido mediante o cultivo (cultura) de uma célula hospedeira transfectada com um vetor de expressão que codifica essa proteína, sob condições que permitem a expressão do polipeptídeo. Após a expressão, o polipeptídeo pode ser colhido e purificado ou

isolado utilizando técnicas conhecidas na técnica, por exemplo, marcadores de afinidade tais como Proteína A, Proteína G, glutathione-S-transferase (GST) e marcadores de histidina.

### III. Vetores de Expressão

[0064] As proteínas de fusão de interesse podem ser expressas em uma célula de interesse mediante a incorporação de um gene que codifica uma proteína de fusão de interesse em um vetor de expressão apropriado. Como aqui utilizado, "vetor de expressão" refere-se a um vetor compreendendo um polinucleotídeo recombinante compreendendo sequências de controle de expressão ligadas de maneira operável a uma sequência de nucleotídeos a ser expressa. Um vetor de expressão compreende elementos de ação cis suficientes para expressão; outros elementos para expressão podem ser fornecidos pela célula hospedeira ou em um sistema de expressão in vitro. Os vetores de expressão incluem todos aqueles conhecidos na técnica, tais como cosmídeos, plasmídeos (por exemplo, nus ou contidos em lipossomos), retrotranspósons (por exemplo, transportar, adormecida) e vírus (por exemplo, lentivírus, retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados) que incorporam o polinucleotídeo recombinante de interesse.

[0065] Em certas modalidades, um vetor de expressão divulgado é um vetor viral. Os termos "vetor viral" e "vírus" são utilizados aqui de modo trocável para se referir a qualquer um dos parasitas intracelulares obrigatórios que não possuem mecanismo de síntese de proteína ou de geração de energia. O genoma viral pode ser RNA ou DNA. Os vírus úteis na prática da presente invenção incluem vírus de DNA e RNA com envoltórios ou sem envoltórios modificados de forma recombinante, preferivelmente selecionados de baculoviridae, parvoviridae, picornoviridae, herpesviridae, poxviridae ou adenoviridae. Os vírus podem ser modificados por técnicas de DNA recombinante para incluir

a expressão de transgenes exógenos e podem ser modificados para serem deficientes em replicação, replicantes condicionais ou competentes em replicação. Os vetores virais quiméricos que exploram elementos vantajosos de cada uma das propriedades do vetor de origem (Ver, por exemplo, Feng *et al.* (1997) NATURE BIOTECHNOLOGY 15:866-870) também podem ser úteis na prática da presente invenção. Embora seja geralmente favorável empregar um vírus da espécie a ser tratada, em alguns casos pode ser vantajoso utilizar vetores derivados de diferentes espécies que possuem características patogênicas favoráveis. Por exemplo, os vetores do vírus da herpes equina para terapia genética humana são descritos na Publicação PCT No. WO 98/27216. Os vetores são descritos como úteis para o tratamento de seres humanos, visto que o vírus equino não é patogênico para os seres humanos. Da mesma forma, os vetores adenovirais de ovinos podem ser utilizados na terapia gênica humana, visto que eles são reivindicados para evitar os anticorpos contra os vetores adenovirais humanos. Tais vetores são descritos na Publicação PCT No. WO 97/06826.

[0066] Em certas modalidades, o vetor viral é um adenovírus. Os adenovírus são vírus icosaédricos de tamanho médio (90 a 100 nm), sem envoltórios (nus), compostos de um nucleocapsídeo e um genoma de DNA linear de fita dupla. Os adenovírus se replicam no núcleo das células de mamíferos utilizando o mecanismo de replicação do hospedeiro. O termo "adenovírus" refere-se a qualquer vírus do gênero Adenoviridae incluindo, mas não limitado a subgêneros de adenovírus humano, bovino, ovino, equino, canino, suíno, murino e símio. Em particular, os adenovírus humanos incluem os subgêneros de A-F, assim como os seus sorotipos individuais, os sorotipos individuais e os subgêneros de A-F, mas não limitados a estes, os adenovírus humanos tipos 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 (Ad11a e Ad11p), 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 19a, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,

32, 33, 34, 34a, 35, 35p, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 91. Preferidos são os vetores derivados de adenovírus humano tipos 2 e 5. Salvo indicação em contrário, todos os números de nucleotídeo do adenovírus tipo 5 são relativos à sequência de referência NCBI AC\_000008.1, que é representada aqui na SEQ ID NO: 52.

[0067] O ciclo de replicação de adenovírus possui duas fases: uma fase inicial, durante a qual 4 unidades de transcrição (E1, E2, E3 e E4) são expressas, e uma fase tardia que ocorre após o início da síntese de DNA viral e durante a qual as transcrições tardias são expressas principalmente a partir do principal promotor tardio (MLP). As mensagens tardias codificam a maioria das proteínas estruturais do vírus. Os produtos gênicos de E1, E2 e E4 são responsáveis pela ativação da transcrição, transformação celular, replicação de DNA viral, assim como outras funções virais, e são necessários para o crescimento viral.

[0068] O termo "ligado de maneira operável" refere-se a uma ligação de elementos de polinucleotídeo em uma conexão funcional. Uma sequência de ácido nucleico é "ligada de maneira operável" quando é colocada em uma conexão funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor ou intensificador está de maneira operável ligado a um gene se ele afeta a transcrição do gene. Sequências de nucleotídeo ligadas de maneira operável são tipicamente contíguas. No entanto, visto que os intensificadores geralmente funcionam quando separados do promotor por várias quilobases e as sequências intrônicas podem ser de comprimentos variáveis, alguns elementos de polinucleotídeo podem estar ligados de maneira operável, mas não diretamente flanqueados e podem até funcionar *in trans* de um alelo ou cromossomo diferente.

#### IV. Modificações da Proteína de Fusão

[0069] Quando utilizada como uma terapêutica, uma proteína de fusão pode ser otimizada (por exemplo, maturada por afinidade) para

melhorar as características bioquímicas incluindo afinidade e/ou especificidade, melhorar propriedades biofísicas incluindo agregação, estabilidade, precipitação e/ou interações não específicas, e/ou reduzir a imunogenicidade. Os procedimentos de maturação por afinidade estão dentro da habilidade prática na técnica. Por exemplo, a diversidade pode ser introduzida em uma proteína de fusão divulgada por rearranjo de DNA, rearranjo de cadeia, rearranjo de CDR, mutagênese aleatória e/ou mutagênese específica do local.

[0070] Geralmente, uma proteína de fusão otimizada possui pelo menos a mesma ou substancialmente a mesma (por exemplo, pelo menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) afinidade para um ligante como a proteína de fusão não otimizada (ou de origem) da qual foi derivada. De preferência, uma proteína de fusão otimizada possui uma maior afinidade com relação a um ligante quando comparada com uma proteína de fusão de origem.

[0071] As proteínas de fusão (por exemplo, variantes de origem e otimizadas) podem ser planejadas para conter certas regiões constantes (isto é, Fc) com uma função efetiva especificada (por exemplo, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)). As regiões constantes humanas são conhecidas na técnica.

[0072] Além disso, se a proteína de fusão for para uso como uma terapêutica, ela pode ser conjugada com um agente efector tal como uma toxina de molécula pequena ou um radionuclídeo, utilizando química padrão de conjugação *in vitro*. Se o agente efector for um polipeptídeo, o anticorpo pode ser quimicamente conjugado ao efector ou unido ao efector como uma proteína de fusão. A construção de proteínas de fusão está dentro da habilidade prática na técnica.

#### V. Métodos de Tratamento

[0073] As proteínas de fusão ou vetores de expressão precedentes podem ser utilizados para tratar várias indicações médicas. Em



certas modalidades, as proteínas de fusão ou vetores de expressão precedentes podem ser utilizados para tratar indicações médicas que são mediadas por uma citocina, por exemplo, IL-10. Por exemplo, as proteínas de fusão e os vetores de expressão podem ser utilizados para tratar vários cânceres ou doenças inflamatórias.

[0074] Como utilizado nesta invenção, "tratar", "tratando" e "tratamento" significam o tratamento de uma doença em um indivíduo, por exemplo, em um mamífero, por exemplo, em um ser humano. Isso inclui: (a) inibir a doença, isto é, interromper seu desenvolvimento; e (b) aliviar a doença, isto é, provocar regressão do estado doentio. Conforme aqui utilizado, os termos "indivíduo" e "paciente" se referem a um organismo a ser tratado pelos métodos e composições aqui descritos. Tais organismos incluem de preferência, mas não são limitados a estes, mamíferos (por exemplo, murinos, símios, equinos, bovinos, suínos, caninos, felinos e similares), e mais preferivelmente incluem seres humanos.

[0075] Em certas modalidades, as proteínas de fusão e os vetores de expressão aqui divulgados podem ser utilizados para tratar vários cânceres. As células cancerígenas são expostas a uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína de fusão ou vetor de expressão, de modo a inibir ou reduzir a proliferação das células cancerígenas. Em certas modalidades, a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão ou vetor de expressão a células cancerígenas reduz a atividade da IL-10 nas células em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95%. A atividade de IL-10 pode ser testada por Western blot como descrito no Exemplo 2. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão ou vetor de expressão divulgado pode ser utilizado para inibir o crescimento de tumores em um indivíduo (por exemplo, um paciente huma-

no, também referido como um indivíduo humano), que pode ser executado mediante a administração de uma quantidade eficaz da proteína de fusão ou vetor de expressão ao indivíduo. Em certas modalidades, a administração de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão ou vetor de expressão a um indivíduo reduz a carga tumoral nesse indivíduo em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90%.

[0076] Exemplos de câncer incluem tumores sólidos, tumores dos tecidos macios, tumores hematopoiéticos e lesões metastáticas. Exemplos de tumores hematopoiéticos incluem leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), ALL de células B, células T ou FAB, leucemia oide mieloide aguda (AML), leucemia mielocítica crônica (CML), leucemia linfocítica crônica (CLL), por exemplo, CLL transformada, linfomas difusos de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, leucemia de células pilosas, síndrome mielodiplásica (MDS), um linfoma, doença de Hodgkin, um linfoma maligno, linfoma não Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiplo ou Síndrome de Richter (Transformação de Richter). Exemplos de tumores sólidos incluem malignidades, por exemplo, sarcomas, adenocarcinomas e carcinomas, dos vários sistemas orgânicos, tais como aqueles que afetam cabeça e pescoço (incluindo faringe), tireoide, pulmão (carcinoma pulmonar de pequenas células ou não pequenas células (NSCLC)), mama, linfóide, gastrointestinal (por exemplo, oral, esofágico, estômago, fígado, pâncreas, intestino delgado, cólon e reto, canal anal), órgãos genitais e trato geniturinário (por exemplo, renal, urotelial, bexiga, ovário, uterino, cervical, endometrial, próstata, testicular), CNS (por exemplo, células neurais ou gliais, por exemplo, neuroblastoma ou glioma) ou pele (por exemplo, melanoma).

[0077] Em certas modalidades, o câncer é selecionado de melanoma, carcinoma de células escamosas da pele, carcinoma basocelu-

lar, câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama, câncer anal, câncer cervical, câncer de pulmão de não pequenas células, mesotelioma, câncer de pulmão de pequenas células, carcinoma de células renais, câncer de próstata, câncer gastroesofágico, câncer colorretal, câncer testicular, câncer de bexiga, câncer de ovário, câncer de fígado, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, câncer de cérebro e sistema nervoso central, câncer de tireoide, câncer de paratireoide (por exemplo, carcinoma de paratireoide), câncer endometrial, câncer neuroendócrino, linfoma (por exemplo, Hodgkin e não Hodgkin), leucemia, carcinoma de células de Merkel, tumores estromais gastrointestinais, mieloma múltiplo, câncer uterino, um sarcoma, câncer renal, câncer ocular, câncer pancreático e um câncer de células germinativas (por exemplo, câncer de células germinativas do ovário). Em certas modalidades, o câncer pode ser selecionado de leucemia, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de endométrio, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer cervical, câncer de cérebro, câncer de pele, câncer colorretal, câncer de estômago, câncer de cabeça e pescoço, e leucemia. Em certas modalidades, o câncer é selecionado de leucemia, câncer de mama, câncer cervical, câncer colorretal, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de estômago, câncer de cabeça e pescoço, câncer de endométrio e câncer de ovário.

[0078] Em certas modalidades, uma proteína de fusão ou vetor de expressão da divulgação é administrada para diminuir os níveis de uma ou mais citocinas em um indivíduo com sua necessidade (por exemplo, um indivíduo com uma condição inflamatória). Em certas modalidades, uma proteína de fusão ou vetor de expressão divulgada pode ser utilizada para tratar uma condição inflamatória em um indivíduo (por exemplo, um indivíduo humano), o que pode ser consumado através da administração de uma quantidade eficaz da proteína de fu-

são ou vetor de expressão ao indivíduo.

[0079] Como aqui utilizado, uma condição inflamatória é uma doença ou condição caracterizada, no todo ou em parte, pela inflamação ou uma resposta inflamatória no paciente. As condições inflamatórias tratáveis utilizando as proteínas de fusão ou vetores de expressão da invenção podem ser caracterizadas, por exemplo, com base no tecido primário afetado, no mecanismo de ação subjacente à condição ou na parte do sistema imunológico que é regulada ou superativa de maneira inadequada. Em certas modalidades, exemplos de condições inflamatórias que podem ser tratadas incluem inflamação dos pulmões (por exemplo, asma, síndrome da angústia respiratória do adulto, bronquite, inflamação pulmonar, fibrose pulmonar e fibrose cística), articulações (por exemplo, artrite reumatoide, espondilite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, osteoartrite, artrite gotosa e outras condições artríticas), tecido conjuntivo, olhos (por exemplo, uveíte (incluindo irite), conjuntivite, esclerite e ceratoconjuntivite seca), nariz, intestino (por exemplo, doença de Crohn, colite ulcerosa, doença inflamatória intestinal, síndrome intestinal inflamatória e proctite distal), rim (por exemplo, glomerulonefrite, nefrite intersticial, nefrite lúpica, nefrite secundária à doença de Wegener, insuficiência renal aguda secundária à nefrite aguda, síndrome de Goodpasture, síndrome pós-obstrutiva e isquemia tubular), fígado (por exemplo, hepatite (decorrente de infecção viral, respostas autoimunes, tratamentos medicamentosos, toxinas, agentes ambientais ou como uma consequência secundária de um distúrbio primário), obesidade, atresia biliar, cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária), pele (por exemplo, psoríase, eczema e dermatite, e. dermatites eczematosas, dermatite tópica e seborréica, dermatite alérgica ou irritante de contato, rachadura de eczema, dermatite fotoalérgica, dermatite fototóxica, fitofotodermatite, dermatite por radiação e dermatite de estase), sistema nervoso central (por

exemplo, esclerose múltipla e doenças neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson ou demência associada à infecção pelo HIV), sistema vascular (por exemplo, dano ao infarto coronário, doença vascular periférica, miocardite, vasculite, revascularização da estenose, aterosclerose e doença vascular associada com o diabetes tipo II), sistema endócrino (por exemplo, tireoidite autoimune (doença de Hashimoto), diabetes tipo I, inflamação no fígado e tecido adiposo associado ao diabetes tipo II e inflamação aguda e crônica do córtex adrenal), coração ou tecido adiposo. A presente invenção contempla que algumas condições inflamatórias envolvem inflamação em múltiplos tecidos. Além do mais, a presente invenção contempla que algumas condições inflamatórias podem cair em múltiplas categorias. Em certas modalidades, a condição inflamatória é uma doença autoimune. Doenças autoimunes exemplares incluem, mas não são limitados a estas, artrite reumatoide, psoríase (incluindo psoríase em placas), artrite psoriática, espondilite anquilosante, colite ulcerativa, esclerose múltipla, lúpus, alopecia, pancreatite autoimune, doença celíaca, doença de Behcet, síndrome de Cushing e doença de Grave. Em certas modalidades, a condição inflamatória é um distúrbio reumatoide. Distúrbios reumatoides exemplares incluem, mas não são limitados a estes, artrite reumatoide, artrite juvenil, bursite, espondilite, gota, esclerodermia, doença de Still e vasculite. Note-se que certas categorias de condições se sobrepõem. Por exemplo, a artrite reumatoide é um distúrbio reumatoide inflamatório, um distúrbio inflamatório das articulações e um distúrbio autoimune.

[0080] O termo "quantidade eficaz", conforme aqui utilizado, refere-se à quantidade de um componente ativo (por exemplo, a quantidade de uma proteína de fusão ou vetor de expressão da presente invenção) suficiente para efetuar resultados benéficos ou desejados. Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais admi-

nistrações, aplicações ou dosagens e não se destina a ser limitada a uma formulação ou via de administração particular.

[0081] Em certas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão está na faixa de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg, por exemplo, 1 mg/kg a 100 mg/kg, 1 mg/kg a 10 mg/kg, 1 mg/kg a 5 mg/kg, 10 mg/kg, 7,5 mg/kg, 5 mg/kg ou 2,5 mg/kg. Em certas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vetor de expressão, por exemplo, um vírus recombinante, está na faixa de  $10^2$  a  $10^{15}$  unidades formadoras de placas (pfus), por exemplo,  $10^2$  a  $10^{10}$ ,  $10^2$  a  $10^5$ ,  $10^5$  a  $10^{15}$ ,  $10^5$  a  $10^{10}$  ou  $10^{10}$  a  $10^{15}$  unidades formadoras de placas. A quantidade administrada dependerá de variáveis tais como o tipo e a extensão da doença ou indicação a ser tratada, a saúde geral do paciente, a potência *in vivo* da proteína de fusão ou vetor de expressão, a formulação farmacêutica e a via de administração. A dosagem inicial pode ser aumentada além do nível superior, a fim de alcançar rapidamente o nível sanguíneo ou tecidual desejado. Alternativamente, a dosagem inicial pode ser menor do que a ideal, e a dosagem diária pode ser aumentada progressivamente durante o curso do tratamento. A dosagem humana pode ser otimizada, por exemplo, em um estudo convencional de escalonamento de dose de Fase I projetado para operar de 0,5 mg/kg a 20 mg/kg. A frequência de dosagem pode variar, dependendo de fatores tais como via de administração, quantidade de dosagem, meia-vida sérica do anticorpo e a doença a ser tratada. As frequências de dosagem exemplares são uma vez por dia, uma vez por semana e uma vez a cada duas semanas. Uma via de administração preferida é a parenteral, por exemplo, infusão intravenosa. A formulação de drogas à base de proteínas de fusão ou de vetores de expressão está dentro da habilidade prática na técnica. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão ou vetor de expressão é liofilizada e, em seguida, reconstituída em solução salina tamponada,

no momento da administração.

[0082] Para uso terapêutico, uma proteína de fusão ou vetor de expressão é preferencialmente combinada com um veículo farmacêuticamente aceitável. Como aqui utilizado, "veículo farmacêuticamente aceitável" significa tampões, veículos e excipientes adequados para uso em contato com tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica ou outro problema ou complicação, proporcional a uma relação de benefício/risco razoável. Os veículos devem ser "aceitáveis" no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes das formulações e não prejudiciais para o destinatário. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem tampões, solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes isotônicos e retardadores de absorção e similares, que são compatíveis com a administração farmacêutica. A utilização de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é conhecida na técnica.

[0083] As composições farmacêuticas contendo proteínas de fusão ou vetores de expressão aqui divulgados podem ser apresentadas em uma forma de unidade de dosagem e podem ser preparadas por qualquer método adequado. Uma composição farmacêutica deve ser formulada para ser compatível com a via de administração planejada. Exemplos de vias de administração são administrações intravenosas (IV), intradérmicas, inalatórias, intraoculares, intranasais, transdérmicas, tópicas, transmucosais e retais.

[0084] Uma via de administração preferida para proteínas de fusão é a infusão IV. As formulações úteis podem ser preparadas por métodos conhecidos na técnica farmacêutica. Por exemplo, ver *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990). Os componentes da formulação adequados para administração parenteral incluem um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou



outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tais como EDTA; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos; e agentes para o ajuste da tonicidade tais como cloreto de sódio ou dextrose.

[0085] Para a administração intravenosa, veículos adequados incluem soro fisiológico, água bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) ou solução salina tamponada com fosfato (PBS). O veículo deve ser estável sob condições de fabricação e armazenamento e deve ser conservado contra microorganismos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido) e suas misturas adequadas.

[0086] As formulações farmacêuticas são preferivelmente estéreis. A esterilização pode ser executada por qualquer método adequado, por exemplo, filtração através de membranas de filtração estéreis. Onde a composição é liofilizada, a esterilização por filtro pode ser conduzida antes ou após a liofilização e reconstituição. Em certas modalidades, um veículo de liberação (por exemplo, um vírus recombinante) e/ou um agente terapêutico da invenção é administrado em combinação com um inibidor do ponto de verificação, por exemplo, um anticorpo anti-CTLA-4, um anticorpo anti-PD-1, ou um anticorpo anti-PD-L1. Anticorpos anti-PD-1 exemplares incluem, por exemplo, nivolumab (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb Co.), pembrolizumab (Keytruda®, Merck Sharp & Dohme Corp.), PDR001 (Novartis Pharmaceuticals) e pidilizumab (CT-011, Cure Tech). Anticorpos anti-PD-L1 exemplares incluem, por exemplo, atezolizumab (Tecentriq®, Genentech), duvalumab (AstraZeneca), MEDI4736, avelumab (Bavencio®, EMD Serono), e BMS 936559 (Bristol Myers Squibb Co.).

[0087] O termo administrado "em combinação", como utilizado



nesta invenção, entende-se de significar que dois (ou mais) tratamentos diferentes são liberados ao indivíduo durante o curso da aflição do indivíduo com o distúrbio, de tal modo que os efeitos dos tratamentos sobre o indivíduo se sobrepõem em um momento. Em certas modalidades, a liberação de um tratamento ainda está ocorrendo quando a liberação do segundo começa, para que haja sobreposição em termos de administração. Às vezes, isso é referido aqui como "liberação simultânea" ou "concomitante". Em outras modalidades, a liberação de um tratamento termina antes que a liberação do outro tratamento se inicie. Em algumas modalidades de cada caso, o tratamento é mais eficaz devido à administração combinada. Por exemplo, o segundo tratamento é mais eficaz, por exemplo, um efeito equivalente é observado com menos do segundo tratamento ou o segundo tratamento reduz os sintomas em uma maior extensão do que seria visto se o segundo tratamento fosse administrado na ausência do primeiro tratamento, ou a situação análoga é vista com o primeiro tratamento. Em certas modalidades, a liberação 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 liberado na ausência do outro. O efeito dos dois tratamentos pode ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo ou superior ao aditivo. A liberação pode ser tal que um efeito do primeiro tratamento liberado ainda seja detectável quando o segundo for liberado.

[0088] Ao longo da descrição, onde as composições, dispositivos e sistemas são descritos como tendo, incluindo ou compreendendo componentes específicos, ou onde processos e métodos são descritos como tendo, incluindo ou compreendendo etapas específicas, contempla-se que, adicionalmente, existem composições, dispositivos e sistemas da presente invenção que consistem essencialmente nos, ou consistem nos, componentes citados, e que existem processos e métodos de acordo com a presente invenção que consistem essencial-

mente nas, ou consistem nas, etapas de processamento citadas.

[0089] No pedido, onde se diz que um elemento ou componente está incluído e/ou selecionado de uma lista de elementos ou componentes recitados, deve ficar entendido que o elemento ou componente pode ser qualquer um dos elementos ou componentes recitados, ou o elemento ou componente pode ser selecionado de um grupo que consiste em dois ou mais dos elementos ou componentes recitados.

[0090] Além disso, deve ficar entendido que elementos e/ou características de uma composição ou um método descrito nesta invenção podem ser combinados de várias maneiras, sem se afastar do espírito e do escopo da presente invenção, sejam aqui explícitos ou implícitos. Por exemplo, onde é feita referência a um vírus particular, esse vírus pode ser utilizado em várias modalidades de composições da presente invenção e/ou em métodos da presente invenção, a menos que seja entendido de outra forma a partir do contexto. Em outras palavras, dentro deste pedido, as modalidades foram descritas e representadas de uma maneira que permite que uma aplicação clara e concisa seja escrita e desenhada, mas é planejado e será observado que as modalidades podem ser combinadas ou separadas de várias maneiras sem se separar dos presentes ensinamentos e invenções. Por exemplo, será observado que todas as características descritas e representadas nesta invenção podem ser aplicáveis a todos os aspectos das invenções aqui descritas e representadas.

[0091] Deve ficar entendido que a expressão "pelo menos um de" inclui individualmente cada um dos objetos recitados após a expressão e as várias combinações de dois ou mais dos objetos recitados, a menos que seja entendido de outra forma a partir do contexto e uso. A expressão "e/ou" em conexão com três ou mais objetos recitados deve ser compreendida de ter o mesmo significado, a não ser que de outra maneira compreendida a partir do contexto.

[0092] O uso do termo "incluir", "inclui", "incluindo", "possuir", "possui", "tendo", "conter", "contém" ou "contendo", incluindo seus equivalentes gramaticais, deve ser entendido de uma forma geral como aberto e não limitativo, por exemplo, não excluindo os elementos ou etapas adicionais não recitados, a não ser que especificamente mencionado ou compreendido de outra maneira a partir do contexto.

[0093] Onde o uso do termo "cerca de" está antes de um valor quantitativo, a presente invenção também inclui o próprio valor quantitativo específico, a menos que seja especificado de outra forma. Conforme utilizado nesta invenção, o termo "cerca de" refere-se a uma variação de  $\pm 10\%$  do valor nominal, a não ser que de outra maneira indicada ou inferida.

[0094] Deve ficar entendido que a ordem das etapas ou a ordem para executar determinadas ações é imaterial, contanto que a presente invenção permaneça operacional. Além disso, duas ou mais etapas ou ações podem ser conduzidas simultaneamente.

[0095] O uso de qualquer um e todos os exemplos ou linguagem exemplar nesta invenção, por exemplo, "tal como" ou "incluindo", destina-se apenas para melhor ilustrar a presente invenção e não representa uma limitação no escopo da invenção, a menos que reivindicado. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicativo de qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da presente invenção.

### EXEMPLOS

[0096] Os seguintes Exemplos são meramente ilustrativos e não se destinam a limitar o escopo ou o conteúdo da invenção de modo algum.

#### Exemplo 1: Construção do Plasmídeo de Proteína de Fusão IL-10RA

[0097] Este exemplo descreve a produção de plasmídeos e vetores de expressão viral que codificam as proteínas de fusão IL-10RA.

[0098] Sequências de nucleotídeo que codificam uma série de proteínas de fusão IL-10RA humanas foram geradas. Uma primeira proteína de fusão, hIL-10R-IgG1 (SEQ ID NO: 58), incluiu os resíduos 1 a 229 da IL-10RA humana (terminando em SLTRQ), imediatamente seguidos pelos resíduos 84 a 330 da sequência de IgG1 humana (começando com NVN HK). Uma segunda proteína de fusão, hIL-10R-Fc (SEQ ID NO: 48), incluiu os resíduos 1 a 235 da IL-10RA humana (terminando com FTVTN), imediatamente seguidos pelos resíduos 104 a 324 da IgG1 humana (começando em DKTHT). Os detalhes das proteínas de fusão são mostrados na Tabela 3.

**TABELA 3**

<b>Proteína de Fusão</b>	<b>Resíduos de hIL-10RA</b>	<b>Resíduos de hIgG1</b>	<b>Junção de hIL-10RA-hIgG1</b>
hIL-10R-IgG1	1 a 229	84 a 330	SLTRQ-NVN HKPSNTKVDKRVEPKSC DKT
hIL-10R-Fc	1 a 235	104 a 324	SLTRQYFTVTN-DKTHT

[0099] As sequências de nucleotídeo que codificam as proteínas de fusão foram clonadas em plasmídeos para aplicações a jusante, conforme apropriado. Em particular, vetores adenovirais recombinantes foram gerados os quais não expressavam transgene, hIL-10R-IgG1 ou hIL-10RA-Fc.

**Exemplo 2:** Atividade da Proteína de Fusão IL-10R

[00100] As células A549 (células de câncer de pulmão humano) foram infectadas com vetores virais que não expressam transgene, hIL-10R-IgG1 ou hIL-10RA-Fc, conforme descrito no Exemplo 1, em 10 MOI, e cultivadas durante quatro dias. O meio condicionado da cultura celular foi coletado e as células THP-1 (monócitos leucêmicos humanos) foram colocadas em suspensão no meio condicionado em  $5 \times 10^6$  células/ml. As células foram tratadas com IL-10 humana em 50 ng/ml a 37 °C durante 30 minutos ou mantidas como controles. Para testar a

atividade da IL-10, a proteína celular extraída das células THP-1 foi sondada por Western blot para Stat3 fosforilado. Stat3 total foi utilizado como controle de carga.

[00101] A IL-10 induziu a fosforilação de Stat3 em células THP-1 cultivadas em meio condicionado a partir de células infectadas com vetores virais que não expressam nenhum transgene ou hIL-10RA-Fc. No entanto, a IL-10 não induziu a fosforilação de Stat3 nas células THP-1 cultivadas em meio condicionado a partir de células infectadas com o vírus que expressa hIL10R-IgG. Estes resultados demonstram que a proteína de fusão hIL-10R-IgG1 bloqueou a IL-10 de ativar a cascata de sinalização de Stat3.

#### INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[00102] Toda a divulgação de cada um dos documentos de patente e artigos científicos aqui mencionados é incorporada por referência para todos os propósitos.

#### EQUIVALENTES

[00103] A invenção pode ser incorporada em outras formas específicas sem se afastar do espírito ou das suas características essenciais. As modalidades anteriores devem, portanto, ser consideradas em todos os aspectos ilustrativos, e não limitativos, na invenção aqui descrita. O escopo da invenção é, portanto, indicado pelas reivindicações anexas, e não pela descrição anterior, e todas as alterações que se enquadram no significado e na faixa de equivalência das reivindicações devem ser adotadas nesta invenção.

## REIVINDICAÇÕES

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

- (i) uma parte de um receptor de IL-10; e
- (ii) um ligante de aminoácido; e pelo menos um de
- (iii) uma parte de um domínio extracelular, domínio da transmembrana ou domínio intracelular de uma citocina, receptor de citocina ou proteína imunomoduladora;
- (iv) uma região de dobradiça de imunoglobulina (Ig); ou
- (v) um domínio Fc de imunoglobulina (Ig).

2. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende de cerca de 5 a cerca de 40 resíduos de aminoácido.

3. Proteína de fusão isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma orientação N- a C-terminal:

- (i) uma parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de IL-10;
  - (ii) um ligante de aminoácido;
  - (iii) uma região de dobradiça de imunoglobulina (Ig); e
  - (iv) um domínio Fc de imunoglobulina (Ig);
- em que o ligante compreende de cerca de 5 a cerca de 40 resíduos de aminoácido.

4. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende de cerca de 5 a cerca de 30 resíduos de aminoácido.

5. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende de cerca de 5 a cerca de 20 resíduos de aminoácido.

6. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o ligante com-

preende de cerca de 5 a cerca de 15 resíduos de aminoácido.

7. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende de cerca de 10 a cerca de 40 resíduos de aminoácido.

8. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende de cerca de 10 a cerca de 30 resíduos de aminoácido.

9. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende de cerca de 10 a cerca de 20 resíduos de aminoácidos.

10. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende de cerca de 10 a cerca de 15 resíduos de aminoácidos.

11. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende uma sequência derivada de uma proteína humana endógena.

12. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende uma parte C-terminal de um domínio CH1 de imunoglobulina (Ig).

13. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o domínio CH1 de Ig é selecionado de um domínio CH1 de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM.

14. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54

e SEQ ID NO: 57.

15. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o domínio CH1 de Ig é um domínio CH1 de IgG1.

16. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 e SEQ ID NO: 57.

17. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 57.

18. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende uma sequência derivada de uma proteína humana selecionada de albumina e caseína.

19. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11.

20. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende uma sequência derivada de uma citocina, molécula de sinalização, proteína imunomoduladora ou um peptídeo.

21. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende um sítio de clivagem.

22. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que o sítio de clivagem é um sítio de clivagem proteolítica.

23. Proteína de fusão isolada, de acordo com a reivindica-



ção 22, caracterizada pelo fato de que o sítio de clivagem proteolítica é clivado por uma protease que está presente no retículo endoplasmático ou golgi de uma célula eucariótica.

24. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 22 ou 23, caracterizada pelo fato de que o sítio de clivagem proteolítica é um sítio de clivagem de furina.

25. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o sítio de clivagem de furina compreende  $RX_1X_2R$  (SEQ ID NO: 50), em que  $X_1$  é qualquer aminoácido e  $X_2$  é Lys ou Arg.

26. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que o sítio de clivagem de furina compreende RAKR (SEQ ID NO: 51).

27. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizada pelo fato de que o ligante compreende uma sequência de aminoácidos que é proteoliticamente estável em um mamífero ou planta.

28. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizada pelo fato de que o receptor de IL-10 é um receptor de IL-10 humano.

29. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que a porção solúvel de um domínio extracelular de um receptor de IL-10 compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 12.

30. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que a parte solúvel de um domínio extracelular de um receptor de IL-10 compreende os resíduos de aminoácido 22 a 229 da SEQ ID NO: 12.

31. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizada pelo fato de que o domínio Fc

de Ig e a região de dobradiça são selecionados de um domínio e região de dobradiça humano de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e Fc IgM.

32. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que o domínio Fc de Ig e a região de dobradiça compreendem uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 e SEQ ID NO: 21.

33. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de que o domínio Fc de Ig e a região de dobradiça são um domínio Fc de IgG1 humano e uma região de dobradiça.

34. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que o domínio Fc de Ig e a região de dobradiça compreendem a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 13.

35. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 34, caracterizada pelo fato de que o domínio Fc de Ig, a região de dobradiça de Ig e o domínio CH1 de Ig são derivados de uma única imunoglobulina.

36. Proteína de fusão isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 58.

37. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão compreen-

de uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 58.

38. Proteína de fusão isolada de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 58.

39. Proteína de ligação a citocina compreendendo duas proteínas de fusão como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 38, caracterizada pelo fato de que cada proteína de fusão compreende um domínio extracelular de um receptor de citocina, em que as duas proteínas de fusão estão ligadas covalentemente e em que os dois domínios extracelulares definem entre si um sítio de ligação para a ligação de uma citocina.

40. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica a proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 39.

41. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico como definido na reivindicação 40.

42. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão como definido na reivindicação 41.

43. Método para a produção de uma proteína de fusão, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) cultivar a célula hospedeira como definida na reivindicação 42 em condições para expressar a proteína de fusão; e
- (b) purificar a proteína de fusão.

44. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende: (i) a proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 39 ou o vetor de expressão como definido na reivindicação 41; e (ii) pelo menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

45. Método para a expressão de uma proteína de fusão em

uma célula alvo, caracterizado pelo fato de que compreende expor a célula a uma quantidade eficaz do vetor de expressão como definido na reivindicação 41 para expressar a proteína de fusão.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão é clivada pós-translação em duas cadeias de polipeptídeo.

47. Método para a inibição da proliferação de uma célula tumoral, caracterizado pelo fato de que compreende expor a célula a uma quantidade eficaz da proteína de fusão dimérica de acordo com a reivindicação 39 para inibir a proliferação da célula tumoral.

48. Método para a inibição da proliferação de uma célula tumoral, caracterizado pelo fato de que compreende expor a célula a uma quantidade eficaz da proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 38, para inibir a proliferação da célula tumoral.

49. Método para inibição do crescimento de tumores em um indivíduo com sua necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz da proteína de fusão dimérica de acordo com a reivindicação 39 para inibir o crescimento do tumor.

50. Método para inibição do crescimento de tumores em um sujeito com sua necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz da proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 38 para inibir o crescimento do tumor.

51. Método de tratamento de câncer em um indivíduo com sua necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade eficaz da proteína de fusão dimérica de acordo com a reivindicação 39 ao indivíduo.

52. Método de tratamento de câncer em um indivíduo com

sua necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade eficaz da proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 38 ao indivíduo.

53. Método para a redução da atividade de IL-10 em uma célula, caracterizado pelo fato de que compreende expor a célula a uma quantidade eficaz da proteína de fusão dimérica de acordo com a reivindicação 39 para reduzir a atividade da IL-10.

54. Método para a redução da atividade de IL-10 em uma célula, caracterizado pelo fato de que compreende expor a célula a uma quantidade eficaz da proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 38 para reduzir a atividade da IL-10.

55. Método de tratamento de uma condição inflamatória em um indivíduo com sua necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade eficaz da proteína de fusão dimérica de acordo com a reivindicação 39 ao indivíduo.

56. Método de tratamento de uma condição inflamatória em um indivíduo com sua necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade eficaz da proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 38 ao indivíduo.

57. Método para a inibição da proliferação de uma célula tumoral, caracterizado pelo fato de que compreende expor a célula a uma quantidade eficaz do vetor de expressão como definido na reivindicação 41 para inibir a proliferação da célula tumoral.

58. Método para a inibição do crescimento de tumores em um indivíduo com sua necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz do vetor de expressão como definido na reivindicação 41 para inibir o crescimento do tumor.

59. Método de tratamento de câncer em um indivíduo com sua necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade eficaz do vetor de expressão como definido na reivindicação 41 ao indivíduo.

60. Método para a redução da atividade de IL-10 em uma célula, caracterizado pelo fato de que compreende expor a célula a uma quantidade eficaz do vetor de expressão como definido na reivindicação 41 para reduzir a atividade da IL-10.

61. Método de tratamento de uma condição inflamatória em um indivíduo com sua necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade eficaz do vetor de expressão como definido na reivindicação 41 ao indivíduo.

62. Método de tratamento de uma infecção em um indivíduo com sua necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade eficaz do vetor de expressão como definido na reivindicação 41 ao indivíduo.

63. Método de acordo com a reivindicação 51, 52 ou 59, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado de melanoma, carcinoma de células escamosas da pele, carcinoma basocelular, câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama, câncer anal, câncer cervical, câncer de pulmão de não pequenas células, mesotelioma, câncer de pulmão de pequenas células, carcinoma de células renais, câncer de próstata, câncer gastroesofágico, câncer colorretal, câncer de testículo, câncer de bexiga, câncer de ovário, câncer de fígado, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, câncer de cérebro e sistema nervoso central, câncer de tireoide, câncer de paratireoide (por exemplo, carcinoma de paratireoide), câncer de endométrio, câncer neuroendócrino, linfoma (por exemplo, Hodgkin e não Hodgkin), leucemia, carcinoma de células de merkel, tumores estromais gastrointestinais, mieloma múltiplo, câncer uterino, um sarcoma, câncer renal, câncer ocu-

lar, câncer de pâncreas e câncer de células germinativas (por exemplo, câncer de células germinativas do ovário).

64. Método de acordo com a reivindicação 51, 52 ou 59, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado de leucemia, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de endométrio, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer cervical, câncer de cérebro, câncer de pele, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer de cabeça e pescoço e leucemia.

65. Método de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado de câncer de pele, câncer de cabeça e pescoço e câncer de pulmão.

66. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 52, 55, 56, 58, 59 ou 61 a 65, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão ou o vetor de expressão é administrado ao indivíduo em combinação com uma ou mais terapias selecionadas de cirurgia, radiação, quimioterapia, imunoterapia, terapia hormonal e viroterapia.

67. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 52, 55, 56, 58, 59 ou 61 a 65, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão ou o vetor de expressão é administrado ao indivíduo em combinação com um linfócito.

68. Método de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o linfócito é uma célula T.

69. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que a célula T é uma célula T CAR.

70. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 52, 55, 56, 58, 59 ou 61 a 69, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano ou animal.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano pediátrico.



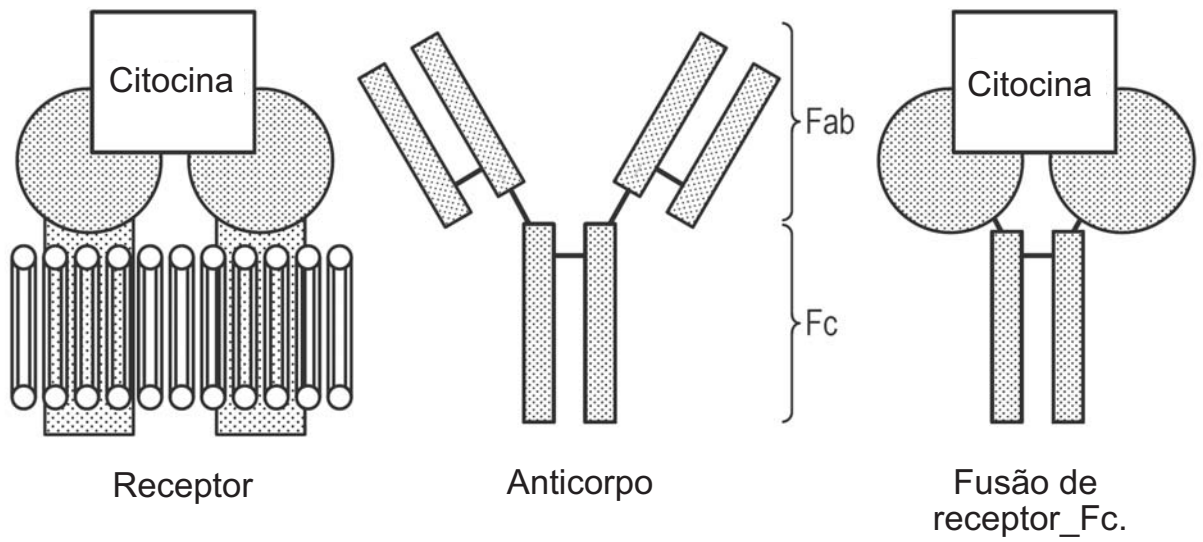


FIG. 1A

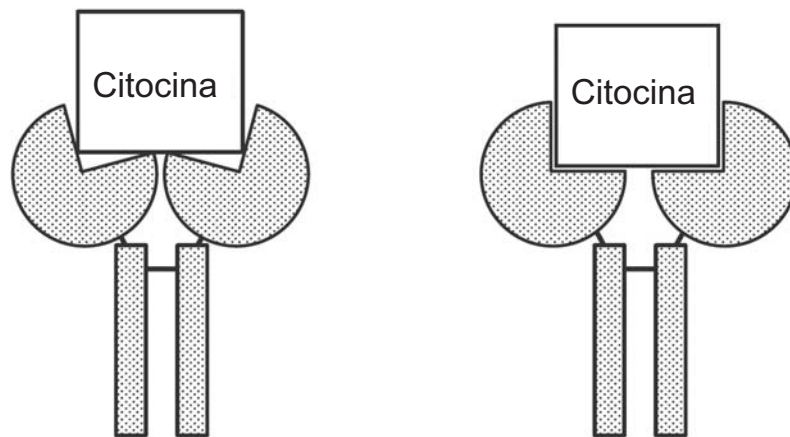


FIG. 1B



## Domínios CH1 humanos

IgA1 PKVFPLS.....LCSTPDQGNV-.....VIACLVQGF.....fPQEPPLSVTWSESGQGV.....tARNFPSPQDASGDL.....YTTSSQLTLPA.....TQCLAGKSVTCHVKH.....-YTNPSQDVT  
 IgA2 PKVFPLS.....LDSTPDQGNV-.....VWACLVQGF.....fPQEPPLSVTWSESGQNV.....tARNFPSPQDASGDL.....YTTSSQLTLPA.....TQCPDGKSVTCHVKH.....-YTNPSQDVT  
 IgD PDVFPLIs.....GCRHPKDNVP.....VLACLVGY.....HPTSVTVTWMTQSQ.....pQRTFPEIQRRDSY.....YMTSSQLSTP.....LQWRQGEYKCVVQH.....-TASKSKKEIF  
 IgE PSVFPLTr.....cCKNIPSNATSV.....TLGCLATGY.....FPEPVMVTWDTGSLn.....GTTMTLPATTLTlsg.....hYATISLLTVSG.....-AWAKQMFTCRVAHt.....pSSTDWVDNKTFs  
 IgG1 PSVFPLA.....PSSKSTSGTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFFPAVLQSSGL.....YSLSSVTVPS.....-SSLGTQTYICNVNH.....KPSNTKVDKKVE  
 IgG2 PSVFPLA.....PCSRSTSEStA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFFPAVLQSSGL.....YSLSSVTVPS.....-SNFGTQTYTCNVdH.....KPSNTKVDKtVE  
 IgG3 PSVFPLA.....PCSRSTSGTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFFPAVLQSSGL.....YSLSSVTVPS.....-SSLGTQTYTCNVNH.....KPSNTKVDKRVE  
 IgG4 PSVFPLA.....PCSRSTSEStA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFFPAVLQSSGL.....YSLSSVTVPS.....-SSLGTQTYTCNVdH.....KPSNTKVDKRVE  
 IgM PTLFPLVs.....CENSPSDTSV.....AVGCLAQDf.....LPDSITILSWKYKNN.....SDISSTRGFPSPVLrg..gkYAATSQVLLPSk.....dVMQGTDEHVCKVQH.....-PNGNKEKNVP

## Domínios CH2 humanos

IgA1 PRLSLHRp.....ALEDLLIGSEA.....NLCTLTlGcl.....rDASGVTFFTWTPSSG.....KSAVQGPPEPDLcg.....cYSVSSVLPgCA.....EPWNHGKTFTCTAAY.....PEskTPlTATILs  
 IgA2 PRLSLHRp.....ALEDLLIGSEA.....NLCTLTlGcl.....rDASGATFTWTPSSG.....KSAVQGPPEPDLcg.....cYSVSSVLPgCA.....QPNNHGETFTCTAAH.....PELKTPlTANIT  
 IgD PAVQDL-.....-WLRDkA--.....TFTCFVVGs.....DLKDAHLTWEVAGKvpt.....ggvEEGLLERHSNGS-.....QSQHSRLTLPR.....SLWNAGTSVTCTLNH.....-PSLPPQRIlMA  
 IgE PTVKIL-.....-QSSCDGGGHFpp..tiQLLCLVssy.....TPGTINITWLEDGQvm.....dVdLSTASTTQEGEL.....ASTQSELTLsQ.....KHwLSDRTYTCQVTYq.....GHTFEDSTKKA  
 IgG1 PSVFFLFPp.....kPKDTILMISRTp.....EVTcVVVDvs.....hEDPEVKFNWYVDGvev.....hNAKTKPREEQYNST.....YRWVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KALPAPIEKTIS  
 IgG2 PSVFFLFPp.....kPKDTILMISRTp.....EVTcVVVDvs.....hEDPEVQFNWYVDGve.....VHNAKTKPREEQFns...tFRVSVLTVVH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KGLPAPIEKTIS  
 IgG3 PSVFFLFPp.....kPKDTILMISRTp.....EVTcVVVDvs.....hEDPEVQFNWYVDGvev.....hNAKTKPREEQYNST.....FRVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KALPAPIEKTIS  
 IgG4 PSVFFLFPp.....kPKDTILMISRTp.....EVTcVVVDvs.....qEDPEVQFNWYVDGve.....VHNAKTKPREEQFns...tYRWVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KGLPSSIEKTIS  
 IgM PKVSVFV.....PPRDGFGNPRk.....sKLICQATGf.....SPRQIQVSMlREGKqvgsg.vttDQVQAEAKESGPTT.....YKVTSLTIKE.....SDWLGQSMFTCRVDH.....-RGLTFQQNAs

FIG. 2

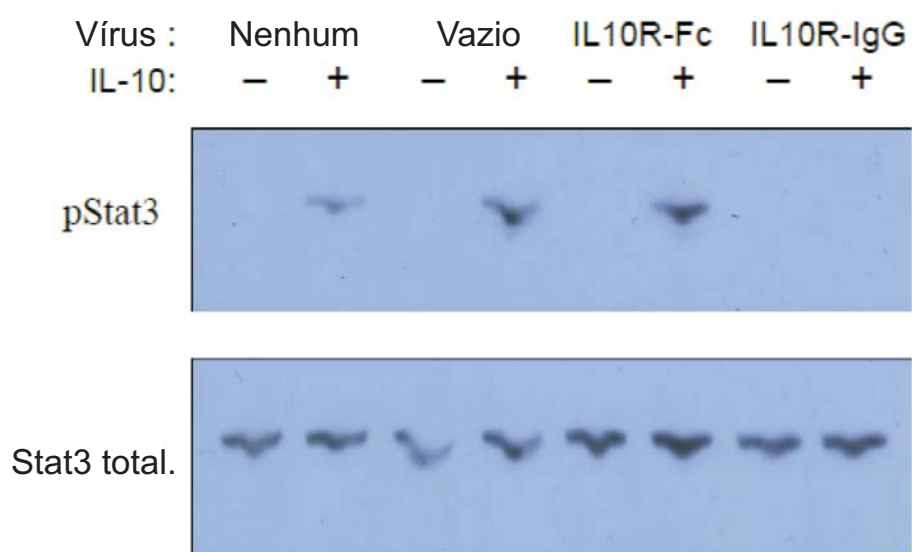


FIG. 3

## RESUMO

Patente de Invenção: **"PROTEÍNAS DE FUSÃO IMUNOMODULADORAS"**.

É fornecida uma proteína de fusão, por exemplo, uma proteína de fusão do receptor de citocina, por exemplo, um coletor de IL-10, com uma nova sequência de ligante para permitir que a proteína de fusão funcione de maneira ideal, por exemplo, para permitir que uma parte do receptor de citocina de uma proteína de fusão do receptor de citocina se ligue de maneira ideal à sua citocina alvo. A proteína de fusão, ou um vetor de expressão que codifica as proteínas de fusão, pode ser utilizado para tratar doenças e distúrbios proliferativos celulares, incluindo certas formas de câncer e distúrbios inflamatórios.