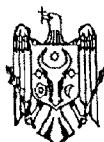




MD/EP 3830120 T3 2023.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3830120 (13) T3

(51) Int. Cl: C07K 16/28 (2006.01.01)
C07K 14/47 (2006.01.01)
A61K 38/00 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2021 0513 (22) Data de depozit: 2019.07.31 (15) Descriere, Revendicări (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 19746089.2, 2019.07.31 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3830120, 2021.06.09 (31) Numărul cererii prioritare: 18186445; 18204548 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2018.07.31; 2018.11.06 (33) Țara cererii prioritare: EP; EP	(48) Data publicării documentului corectat sau modificat: BOPI nr. 11/2023, 2023.11.30 (49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 08/2023, 2023.08.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 21/2023, 2023.05.24 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 06/2021, 2021.06.30
(71) Solicitanți: PIERIS PHARMACEUTICALS GMBH, DE; LES LABORATOIRES SERVIER, FR (72) Inventatori: PAVLIDOU Marina, DE; PATTARINI Lucia, FR; SCHOLER-DAHIREL Alix, FR; ROTHE Christine, DE; OLWILL Shane, DE; BEL AIBA Rachida, DE; HINNER Marlon, DE; PEPER Janet, DE (73) Titular: PIERIS PHARMACEUTICALS GMBH, DE; LES LABORATOIRES SERVIER, FR (74) Mandatar autorizat: SOCOLOVA Sofia	

(54) Noi proteine de fuziune specifice pentru CD137 și PD-L1

(57) Rezumat:

1

Dezvăluirea se referă la protein de fuziune specific atât pentru CD137 cât și pentru PD-L1, care protein de fuziune pot fi utilizate să co-stimuleze activarea limfocitelor într-o manieră dependent de PD-L1-țintă.

2

Astfel de proteine de fuziune pot fi utilizate în multe aplicații farmaceutice, de exemplu ca agenți anti-cancer și/sau ca modulatori imuni pentru tratamentul sau prevenția bolilor umane, cum ar fi diferite tumori. Dezvăluirea de față

MD/EP 3830120 T3 2023.11.30

se referă totodată la metode de fabricare a proteinelor de fuziune descrise aici precum și compoziții care cuprind astfel de protein de fuziune. Dezvăluirea de față se referă în continuare la molecule de acizi nucleici care codifică astfel de protein de fuziune și la metode pentru genearea de astfel de protein de fuziune și molecule de acizi nucleici. În plus,

cererea dezvăluie utilizări terapeutice și/sau de diagnostic al acestor protein de fuziune precum și ale compozițiilor care conțin una sau mai multe astfel de protein de fuziune.

Secvențe: 1

Revendicări: 15

Figuri: 19

(54) Novel fusion protein specific for CD137 and PD-L1

(57) Abstract:

1

The disclosure provides fusion proteins specific for both CD 137 and PD-L1, which fusion protein can be used to co-stimulate lymphocyte activation in a PD-L1-target-dependent manner. Such fusion proteins can be used in many pharmaceutical applications, for example, as anti-cancer agents and/or immune modulators for the treatment or prevention of human diseases such as a variety of tumors. The present disclosure also concerns methods of making the fusion proteins described herein as well as

2

compositions comprising such fusion proteins. The present disclosure further relates to nucleic acid molecules encoding such fusion proteins and to methods for generation of such fusion proteins and nucleic acid molecules. In addition, the application discloses therapeutic and/or diagnostic uses of such fusion proteins as well as compositions comprising one or more of such fusion proteins.

Sequences: 1

Claims: 15

Fig.: 19

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****I. CONTEXT**

Ligandul de moarte programată 1, sau PD-L1 (cunoscut și ca cluster de diferențiere 274 sau CD274 și omologul B7 1 sau B7-H1) este o proteină membranară de tip I cu o singură trecere aparținând familiei B7 de molecule de prezentare a antigenului co-stimulatoare/co-inhibitoare. Porțiunea extracelulară a PD-L1 conține două domenii, un domeniu de tip IgV N-terminal și un domeniu de tip IgC. PD-L1 are un domeniu citoplasmatic scurt, fără niciun motiv evident de transducție a semnalului, ceea ce a condus la credința inițială că nu există semnalizare intrinsecă de către PD-L1 ca receptor. Date recente, totuși, arată că domeniul citoplasmatic al PD-L1 conține motive de transducție a semnalului conservate non-clasice capabile să inhibe transducția interferonului (IFN) și să protejeze celulele canceroase de citotoxicitatea IFN (Gato-Canas și colab., Cell Rep, 2017).

PD-L1 joacă un rol crucial în suprimarea sistemului imunitar în timpul sarcinii, infecțiilor cronice, alogrefelor de țesut, bolilor autoimune și cancerului. PD-L1 este exprimat pe o varietate de tipuri de celule, inclusiv celule B, celule T, macrofage, celule dendritice mieloide, mastocite, celule epiteliale și endoteliale vasculare. De asemenea, este exprimat în mai multe tipuri de cancer, inclusiv, dar fără a se limita la melanom, cancer pulmonar, vezică urinară, colon și sân. Nivelurile ridicate de expresie PD-L1 sunt asociate cu agresivitatea crescută a tumorii prin medierea epuizării și anergiei celulelor T care infiltrază tumora, secreției de citokine imunosupresoare și protecției împotriva lizei de către celulele T citotoxice.

PD-L1 este un ligand al proteinei de moarte celulară programată 1 (PD-1), un receptor cheie inhibitor al punctului de control imun care este exprimat în principal pe celulele T activate, dar și pe alte celule ale sistemului imunitar, inclusiv celulele B și monocitele. PD-1 este un membru al familiei imunoglobulinelor care conține un domeniu extracelular asemănător IgV, un domeniu transmembranar și o coadă citoplasmatică cu un ITIM (motiv inhibitor pe bază de tirozină imunoreceptor) și un ITSM (motiv de comutare pe bază de tirozină imunoreceptor). Angajarea PD-1 de către PD-L1 conduce la recrutarea de src omologie 2 care conține tirozin fosfatazele 1 și 2 (SHP 1 și 2) la motivele de comutare intracelulare ale PD-1 și la exprimarea ligazelor ubiquitină E3 din familia CBL. Aceste ligaze de ubiquitină ubiquitinează și inactivează ulterior mediatorii cheie de transducție a semnalului TCR, ducând la îndepărtarea TCR-urilor de pe suprafața celulei (Karwacz și colab., EMBO Mol Med, 2011). Fosfatazele SHP 1 și SHP 2 inhibă direct semnalizarea TCR prin terminarea fosforilării ZAP70 și PI3K. În plus, PD-1 angajat cu PD-L1 poate provoca inhibarea căilor de semnalizare TCR prin afectarea expresiei și activității CK2 și a kinazelor dependente de ciclină (CDK) (Arasanz și colab., Oncotarget, 2017). S-a arătat, de asemenea, că angajarea PD-1 duce la reprogramarea metabolismului celulelor T de la glicoliză crescută, care este necesară pentru a produce energie pentru funcțiile efectoare, până la β -oxidarea acizilor grași, care este asociat cu celulele cu viață lungă. Acest lucru poate explica, de asemenea, supraviețuirea și persistența celulelor cu exprimare ridicată a PD-1 la pacienții cu infecții cronice și cancer (Patsoukis și colab., Nat Commun, 2015).

Blocarea interacțiunii PD-1/PD-L1 de către agenți de țintire anti-PD-1 sau anti-PD-L1 poate inversa funcția punctului de control imunitar și poate elibera frâna răspunsurilor celulelor T. În prezent, trei anticorpi PD-L1, atezolizumab (TECENTRIQ, MPDL3280A, RG7466), avelumab (BAVENCIO, MSB0010718C) și durvalumab (IMFINZI, MEDI4736), sunt aprobați pentru tratamentul cancerului. Mai multe studii clinice de succes cu acești anticorpi au arătat rate ridicate de răspuns obiectiv, durabilitate a răspunsului sau rate de supraviețuire îmbunătățite în cancerul de vezică urinară, cancerul de piele și cancerul pulmonar (Xu-Monette și colab., Front Immunol, 2017).

Grupul de diferențiere 137 sau CD137 (cunoscut și ca 4-1 BB sau TNFRS9) este un receptor imunitar co-stimulator și un membru al super-familiei receptorilor factorului de necroză tumorală (TNFR). Este exprimat în principal pe celulele T CD4+ și CD8+ activate, celulele B activate și celulele natural killer (NK), dar poate fi găsit și pe monocite și celulele dendritice în repaus (Li și Liu, Clin Pharmacol, 2013), sau celule endoteliale (Snell și colab., Immunol Rev, 2011). CD137 joacă un rol important în reglarea răspunsului imun și, prin urmare, este o țintă pentru imunoterapia cancerului. Ligandul CD137 (CD137L) este singurul ligand natural cunoscut al CD137 și este exprimat constitutiv pe mai multe tipuri de celule prezentatoare de antigen, cum ar fi celulele B activate, monocitele și celulele dendritice splenice și poate fi indus pe limfocitele T.

CD137L este o proteină trimerică care există ca formă legată de membrană și ca variantă solubilă. Capacitatea CD137L solubil de a activa CD137, de exemplu, pe limfocitele care exprimă CD137 este însă limitată și sunt necesare concentrații mari pentru a produce un efect (Wyzgol și colab., J

Immunol, 2009). Modul natural de activare a CD137 este prin angajarea unei celule CD137 pozitive cu o celulă CD137L pozitivă. Se crede apoi că activarea CD137 este indusă prin gruparea prin CD137L pe celula opusă, conducând la semnalizare prin TRAF1, 2 și 3 (Yao și colab., Nat Rev Drug Discov, 2013, Snell și colab., Immunol Rev, 2011) și alte efecte concomitente în aval în celulele T CD137 pozitive. În

5 cazul celulelor T activate prin recunoașterea țintelor lor înrudite, efectele provocate de costimularea CD137 sunt o activare sporită suplimentară, supraviețuire și proliferare îmbunătățite, producerea de citokine proinflamatorii și o capacitate îmbunătățită de a ucide.

Beneficiul costimularii CD137 pentru eliminarea celulelor canceroase a fost demonstrat într-un număr de modele *in vivo*. Expresia forțată a CD137L pe o tumoare, de exemplu, duce la respingerea

10 tumorii (Melero și colab., Eur J Immunol, 1998). De asemenea, expresia forțată a unui scFv anti-CD137 pe o tumoare duce la eliminarea tumorii dependentă de celulele T CD4⁺ și NK (Yang și colab., Cancer Res, 2007, Zhang și colab., Mol Cancer Ther, 2006, Ye și colab., Nat Med, 2002). S-a demonstrat, de asemenea, că un anticorp anti-CD137 administrat sistemic duce la întârzierea creșterii tumorii (Martinet și colab., Gene Ther, 2002).

15 S-a demonstrat că CD137 este un marker excelent pentru celulele T reactive care apar în mod natural în tumorile umane (Ye și colab., Clin Cancer Res, 2014), și că anticorpii anti-CD137 pot fi folosiți pentru a îmbunătăți expansiunea și activitatea limfocitelor infiltrant tumorale CD8⁺ la melanom pentru aplicare în terapia adoptivă cu celule T (Chacon și colab., PLoS One, 2013).

Demonstrarea preclinică a potențialului beneficiu terapeutic al costimularii CD137 a stimulat dezvoltarea anticorpilor terapeutici care vizează CD137, inclusiv BMS-663513 (descriș în U.S. Patent No. 7,288,638) și PF-05082566 (Fisher și colab., Cancer Immunol Immunother, 2012). WO 2017/123650 A2 se referă la molecule care angajează în mod specific 4-1 BB, un membru al superfamiliei receptorilor TNF (TNFRSF). Mai precis, această invenție se referă la molecule multivalente și multispecifice care leagă cel puțin 4-1 BB. WO 2017/215590 A1 se referă la anticorpi anti-PD-L1 sau fragmente ale acestora.

25 Anticorpii sau fragmentele acestora se leagă în mod specific la domeniul imunoglobulinei C al proteinei PD-L1. Marlon J. Hinner și colab.: „Rezumat B023: Angajarea celulelor T costimulatoare printr-o nouă proteină anti-CD137/anti-HER2 bispecifică bazată pe tehnologia Anticalin”, Cancer Immunology Research, vol. 4, nr. 1, 1 ianuarie 2016 & Marlon J Hinner și colab: " Angajarea celulelor T costimulatoare printr-o nouă proteină anti-CD137/anti-HER2 bispecifică bazată pe tehnologia Anticalin"

30 se referă la angajarea celulelor T costimulatoare printr-o proteină anti-CD137/anti-HER2 bispecifică bazată pe o tehnologie muteină de lipocalină. WO 2018/087108 A1 se referă la muteinele de lipocalină umană care leagă CD137 și pot fi utilizate în aplicații farmaceutice, de exemplu, ca agenți anti-cancer și/sau modulatori imuni pentru tratamentul sau prevenirea bolilor umane cum ar fi cancerul, bolile infecțioase și bolile autoimune.

35 Prezentă dezvoltare furnizează, printre altele, noi abordări pentru angajarea simultană a CD137 și PD-L1 prin una sau mai multe proteine de fuziune având proprietăți de specificitate de legare pentru CD137 și specificitate de legare pentru PD-L1.

II. DEFINIȚII

Următoarea listă definește termenii, frazele și abrevierile utilizate în prezenta specificație. Toți termenii enumerați și definiți aici sunt menționați să cuprindă toate formele gramaticale.

40 Așa cum este utilizat aici, dacă nu se specifică altfel, "CD137" înseamnă CD137 uman (huCD137). CD137 uman înseamnă o proteină de lungime completă definită de UniProt Q07011, un fragment al acesteia sau o variantă a acesteia. CD137 este, de asemenea, cunoscut ca 4-1BB, membru al superfamiliei receptorilor factorului de necroză tumorală 9 (TNFRSF9) și indus de activarea limfocitelor (ILA).

45 Așa cum este utilizat aici, dacă nu se specifică altfel, „ligand 1 moarte celulară programată” sau „PD-L1” înseamnă PD-L1 uman (huPD-L1). PD-L1 uman înseamnă o proteină de lungime completă definită de UniProt Q9NZQ7, un fragment al acesteia sau o variantă a acesteia. PD-L1 uman este codificat de gena CD274. PD-L1 este, de asemenea, cunoscut ca cluster de diferențiere 274 (CD274) sau omologul B7 1 (B7-H1).

50 Așa cum este utilizată aici, „afinitatea de legare” descrie capacitatea unei biomolecule (de exemplu, o polipeptidă sau o proteină) din dezvoltare (de exemplu, o muteină de lipocalină, un anticorp, o proteină de fuziune sau orice altă peptidă sau proteină) de a lega o țintă selectată și de a forma un complex. Afinitatea de legare este măsurată printr-un număr de metode cunoscute specialiștilor în domeniu, inclusiv, dar fără a se limita la, titrare prin fluorescență, teste pe bază de test imunosorbent legat de enzime (ELISA), inclusiv ELISA direct și competitiv, metode calorimetrice, cum ar fi calorimetria de titrare izotermă (ITC) și rezonanța plasmonului de suprafață (SPR). Aceste metode sunt bine stabilite în domeniu și câteva exemple de astfel de metode sunt descrise în continuare aici. Afinitatea de legare este astfel raportată ca o valoare a constantei de disociere (K_D), jumătate din concentrația efectivă maximă

(EC₅₀), sau jumătate din concentrația inhibitorie maximă (IC₅₀) măsurate folosind aceste metode. O valoare K_D, EC₅₀, sau IC₅₀ mai mică reflectă o capacitate (afinitate) de legare mai bună (mai mare). În consecință, afinitățile de legare a două biomolecule față de o țintă selectată pot fi măsurate și comparate. Când se compară afinitățile de legare a două biomolecule față de ținta selectată, termenul „aproximativ la fel”, „substanțial aceeași” sau „substanțial similară” înseamnă că o biomoleculă are o afinitate de legare raportată ca valoare K_D, EC₅₀, sau IC₅₀ care este identică sau similară cu o altă moleculă în variabilitatea experimentală a măsurării afinității de legare. Variabilitatea experimentală a măsurării afinității de legare depinde de metoda specifică utilizată și este cunoscută specialiștilor în domeniu.

Așa cum este utilizat aici, termenul „în mod substanțial” se poate referi, de asemenea, la condiția calitativă de a prezenta întinderea sau gradul total sau aproape total al unei caracteristici sau proprietăți de interes. O persoană cu calificare obișnuită în domeniile biologice va înțelege că fenomenele biologice și chimice rareori, sau vreodată, ajung la finalizare și/sau ajung la completitudine sau ating sau evită un rezultat absolut. Prin urmare, termenul „în mod substanțial” este utilizat aici pentru a surprinde lipsa potențială de completitudine inerentă în multe fenomene biologice și chimice.

Așa cum este utilizat aici, termenul "detecta", "detectie", "detectabil" sau "detectare" este înțeles atât la nivel cantitativ cât și calitativ, precum și o combinație a acestora. Acesta include astfel măsurători cantitative, semi-cantitative și calitative efectuate pe o biomoleculă a dezvoltării.

Așa cum este utilizat aici, „afinitate detectabilă” înseamnă în general capacitatea de legare între o biomoleculă și ținta ei, raportată de o valoare K_D, EC₅₀, sau IC₅₀, este de cel mult aproximativ 10⁻⁵ M sau mai mic. O afinitate de legare, raportată de o valoare K_D, EC₅₀, sau IC₅₀, mai mare de 10⁻⁵ M nu mai este, în general, măsurabilă cu metode comune precum ELISA și SPR și, prin urmare, are o importanță secundară.

Se observă că formațiunea complexă dintre biomolecula dezvoltării și ținta acesteia este influențată de mulți factori diferiți, cum ar fi concentrațiile țintei respective, prezența competitorilor, pH-ul și puterea ionică a sistemului tampon utilizat, metoda experimentală utilizată pentru determinarea afinității de legare (de exemplu, titrare prin fluorescență, ELISA competitivă (numită și competiție ELISA) și rezonanța plasmonilor de suprafață) și chiar algoritmul matematic utilizat pentru evaluarea datelor experimentale. Prin urmare, este clar pentru persoana de specialitate că afinitatea de legare raportată de o valoare K_D, EC₅₀, sau IC₅₀ poate varia într-un anumit interval experimental, în funcție de metodă și de configurația experimentală. Aceasta înseamnă că poate exista o ușoară abatere a valorilor K_D, EC₅₀, sau IC₅₀ măsurate sau un interval de toleranță în funcție, de exemplu, dacă astfel de valori au fost determinate prin ELISA (inclusiv ELISA directă sau de competiție), prin SPR sau printr-o altă metodă.

Așa cum este utilizat aici, „specific pentru”, „legare specifică”, „specific legat” sau „specificitate de legare” se referă la capacitatea unei biomolecule de a discrimina între ținta dorită (de exemplu, CD137 și PD-L1) și una sau mai multe ținte de referință (de exemplu, receptorul celular pentru lipocalină asociată gelatinazei neutrofile). Se înțelege că o astfel de specificitate nu este o proprietate absolută, ci o proprietate relativă și poate fi determinată, de exemplu, în conformitate cu SPR, western blot, ELISA, sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS), radioimunotest (RIA), electrochimiluminiscentă (ECL), test imunoradiometric (IRMA), imunohistochimie (IHC) și scări peptidice.

Atunci când este utilizat aici în contextul proteinei de fuziune din prezenta dezvoltare care se leagă la CD137 și PD-L1, termenul „specific pentru”, „legare specifică”, „se leagă în mod specific” sau „specificitate de legare” înseamnă că proteina de fuziune se leagă la, reacționează cu sau este direcționat împotriva CD137 și PD-L1, așa cum este descris aici, dar nu se leagă în mod esențial de altă proteină. Termenul "o altă proteină" include orice proteine care nu sunt CD137 sau PD-L1 sau proteine strâns legate de sau care sunt omoloage cu CD137 sau PD-L1. Cu toate acestea, CD137 sau PD-L1 de la alte specii decât umane și fragmentele și/sau variantele de CD137 sau PD-L1 nu sunt excluse de termenul "o altă proteină". Termenul „nu se leagă în esență” înseamnă că proteinele de fuziune din prezenta dezvoltare leagă o altă proteină cu afinitate de legare mai mică decât CD137 și/sau PD-L1, adică prezintă o reactivitate încrucișată mai mică de 30%, de preferință 20%, mai preferabil 10%, în special preferabil mai puțin de 9, 8, 7, 6 sau 5%. Dacă proteina de fuziune reacționează în mod specific așa cum este definită aici mai sus poate fi testat cu ușurință, inter alia, prin compararea reacției unei proteine de fuziune din prezenta dezvoltare cu CD137 și/sau PD-L1 și reacția respectivei proteine de fuziune cu (o) alta proteina(e).

Așa cum este utilizat aici, termenul "lipocalină" se referă la o proteină monomeră de aproximativ 18-20 kDa în greutate, având o regiune structurală supersecundară cilindrică cu folie pliată cuprinzând o multitudine de catene p (de preferință opt catene p desemnate de la A la H) conectate perechi printr-o multitudine de bucle (de preferință patru) la un capăt pentru a cuprinde astfel un buzunar de legare a ligandului și a defini intrarea în buzunarul de legare a ligandului. Este bine stabilit că diversitatea buclelor

menționate în schela de lipocalină altfel rigidă dă naștere la o varietate de moduri diferite de legare între membrii familiei de lipocaline, fiecare capabil să găzduiască ținte de diferite dimensiuni, formă și caracter chimic (revizuit, de exemplu în Skerra, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower și colab., Biochim Biophys Acta, 2000, Floare, Biochim J, 1996). Se înțelege că familia de proteine lipocaline a evoluat în mod natural pentru a lega un spectru larg de liganzi, împărțind niveluri neobișnuit de scăzute de conservare generală a secvenței (adesea cu identități de secvență mai mici de 20%), păstrând totuși un model de pliere general foarte conservat. Corespondența dintre pozițiile în diferite lipocaline este, de asemenea, binecunoscută unui specialist în domeniu (vezi, de exemplu, U.S. Patent No. 7,250,297). Proteinele care se încadrează în definiția „lipocalinei” așa cum este utilizată aici includ, dar fără a se limita la, lipocaline umane, inclusiv lipocalină lacrimală (Tlc, Lcn1), Lipocalin-2 (Lcn2) sau lipocalină asociată gelatinazei neutrofile (NGAL), apolipoproteina D (ApoD), apolipoproteina M, α_1 -glicoproteina acidă 1, α_1 -glicoproteina acidă 2, α_1 -microglobulina, componenta complementului 8 γ , proteina de legare a retinolului (RBP), proteina de legare a acidului retinoic epididimal, glicodelina, proteina de legare a odorantului Ila, proteina de legare a odorantului lib, lipocalina-15 (Lcn15) și prostaglandina D sintază.

Așa cum este utilizat aici, dacă nu se specifică altfel, "lipocalină lacrimală" se referă la lipocalină lacrimală umană (hTlc) și în plus se referă la lipocalină lacrimală umană matură. Termenul "matur" atunci când este utilizat pentru a caracteriza o proteină înseamnă o proteină în esență lipsită de peptida semnal. O „hTlc matură” din prezenta dezvoltare se referă la forma matură de lipocalină lacrimală umană, care este lipsită de peptida semnal. HTlc matură este descrisă de resturile 19-176 ale secvenței depuse la Banca de date SWISS-PROT sub numărul de acces P31025, și aminoacidul care îi este indicat în SECV ID NR: 1.

Așa cum este utilizat aici, „Lipocalina-2” sau „lipocalină asociată cu gelatinază neutrofilă” se referă la Lipocalina-2 umană (hLcn2) sau lipocalină asociată cu gelatinaza neutrofilă umană (hNGAL) și se referă în plus la Lipocalina-2 umană matură sau lipocalina umană matură neutrofilă asociată gelatinazei. Termenul "matur" atunci când este utilizat pentru a caracteriza o proteină înseamnă o proteină în esență lipsită de peptida semnal. O "hNGAL matură" din prezenta dezvoltare se referă la forma matură de lipocalină asociată cu gelatinaza neutrofilă umană, care este lipsită de peptida semnal. HNGAL matură este descrisă de resturile 21-198 ale secvenței depuse la Banca de date SWISS-PROT sub numărul de acces P80188, și aminoacidul care îi este indicat în SECV ID NR: 2.

Așa cum este utilizată aici, o "secvență nativă" se referă la o proteină sau o polipeptidă având o secvență care apare în natură sau având o secvență de tip sălbatic, indiferent de modul său de preparare. O astfel de proteină sau polipeptidă cu secvență nativă poate fi izolată din natură sau poate fi produsă prin alte mijloace, cum ar fi prin metode recombinante sau sintetice.

"Lipocalină de secvență nativă" se referă la o lipocalină având aceeași secvență de aminoacizi ca și polipeptida corespunzătoare derivată din natură. Astfel, o secvență nativă de lipocalină poate avea secvența de aminoacizi a respectivei lipocaline naturale (de tip sălbatic) de la orice organism, în special, un mamifer. Termenul „secvență nativă”, atunci când este utilizat în contextul unei lipocaline, cuprinde în mod specific formele naturale trunchiate sau secretate ale lipocalinei, formele variante care apar în mod natural, cum ar fi formele îmbinate alternativ și variantele alelice care apar în mod natural ale lipocalinei. Termenii „lipocalină cu secvență nativă” și „lipocalină de tip sălbatic” sunt utilizați în mod interschimbabil aici.

Așa cum este utilizat aici, o "muteină", o entitate "mutată" (fie proteină sau acid nucleic) sau "mutant" se referă la schimbul, ștergerea sau inserția unuia sau mai multor aminoacizi sau nucleotide, în comparație cu proteina sau acidul nucleic care apar în mod natural (de tip sălbatic). Termenul menționat include, de asemenea, fragmente de muteină așa cum sunt descrise aici. Prezenta dezvoltare cuprinde în mod explicit muteinele de lipocalină, așa cum este descris aici, având o regiune structurală supersecundară cilindrică cu folie plisată p, cuprinzând opt fire p conectate în perechi prin patru bucle la un capăt pentru a cuprinde astfel un buzunar de legare a ligandului și a defini intrarea în buzunarul de legare a ligandului, în care cel puțin un aminoacid din fiecare dintre cel puțin trei dintre cele patru bucle menționate a fost mutat în comparație cu secvența nativă de lipocalină.

Așa cum este utilizat aici, termenul „fragment”, în legătură cu muteinele de lipocalină din dezvoltare, se referă la proteine sau polipeptide derivate din hTlc sau hNGAL sau muteine de lipocalină mature de lungime completă care sunt trunchiate N-terminal și/sau C-terminal, adică lipsită de cel puțin unul dintre aminoacizii N-terminal și/sau C-terminal. Astfel de fragmente pot include cel puțin 10 sau mai mulți, cum ar fi 20 sau 30 sau mai mulți aminoacizi consecutivi ai secvenței primare a hTlc sau hNGAL matur sau muteina de lipocalină derivată din aceasta și sunt de obicei detectabile într-un imunotest de hTlc sau hNGAL matur. Unui astfel de fragment îi pot lipsi până la 2, până la 3, până la 4, până la 5, până la 10, până la 15, până la 20, până la 25 sau până la 30 (inclusiv toate numerele dintre ele) aminoacizi N-terminali și/sau C-terminali. Ca exemplu ilustrativ, unui astfel de fragment îi poate lipsi unul, doi, trei sau

patru aminoacizi N-terminali (His-His-Leu-Leu) și/sau unul sau doi aminoacizi C-terminali (Ser-Asp) ai hTlc matur. Se înțelege că fragmentul este de preferință un fragment funcțional de hTlc sau hNGAL matur sau muteina de lipocalină din care este derivat, ceea ce înseamnă că păstrează, de preferință, specificitatea de legare, de preferință la CD137, a hTlc/hNGAL matur sau muteina de lipocalină de la care este derivat. Ca exemplu ilustrativ, un astfel de fragment funcțional poate cuprinde cel puțin aminoacizi la pozițiile 5-153, 5-150, 9-148, 12-140, 20-135 sau 26-133 corespunzătoare secvenței polipeptidice liniare a hTlc matur. Ca un alt exemplu ilustrativ, un astfel de fragment funcțional poate cuprinde cel puțin aminoacizi la pozițiile 13-157, 15-150, 18-141, 20-134, 25-134 sau 28-134 corespunzătoare secvenței polipeptidice liniare a hNGAL matur.

Un "fragment" cu privire la ținta corespunzătoare CD137 sau PD-L1 a unei proteine de fuziune conform dezvoltării, se referă la CD137 sau PD-L1 trunchiat N-terminal și/sau la PD-L1 sau la domeniile proteice ale CD137 sau PD-L1. Fragmentele de CD137 sau fragmentele de PD-L1 așa cum sunt descrise aici păstrează capacitatea CD137 sau PD-L1 de lungime întreagă de a fi recunoscute și/sau legate de o proteină de fuziune conform dezvoltării. Ca exemplu ilustrativ, fragmentul poate fi un domeniu extracelular al CD137 sau PD-L1. Ca exemplu ilustrativ, un astfel de domeniu extracelular poate cuprinde aminoacizi ai subdomeniilor extracelulare ale CD137, cum ar fi secvențele de aminoacizi individuale sau combinate ale domeniului 1 (reziduurile 24-45 din UniProt Q07011), domeniul 2 (reziduurile 46-86), domeniul 3 (87-118) și domeniul 4 (reziduuri 119-159). Ca un alt exemplu ilustrativ, un astfel de domeniu extracelular poate cuprinde resturile de aminoacizi 19-238 ale UniProt Q9NZQ7.

Așa cum este utilizat aici, termenul "variantă" se referă la derivați ai unei proteine sau polipeptide care includ mutații, de exemplu prin substituții, deleții, inserții și/sau modificări chimice ale unei secvențe de aminoacizi sau secvențe de nucleotide. Astfel de substituții pot fi conservatoare, adică un rest de aminoacid este înlocuit cu un rest de aminoacid similar chimic. Exemple de substituții conservatoare sunt înlocuirile dintre membrii următoarelor grupe: 1) alanină, serină, treonină și valină; 2) acid aspartic, acid glutamic, glutamina și asparagină și histidină; 3) arginină, lizină, glutamina, asparagină și histidină; 4) izoleucină, leucină, metionină, valină, alanină, fenilalanină, treonină și prolină; și 5) izoleucină, leucină, metionină, fenilalanină, tirozină și triptofan. Astfel de variante includ proteine sau polipeptide, în care unul sau mai mulți aminoacizi au fost substituiți cu stereoizomerii D respectivi sau cu aminoacizi alții decât cei 20 de aminoacizi naturali, cum ar fi, de exemplu, ornitina, hidroxiprolina, citrulina, homoserină, hidroxilizină, norvalină. Astfel de variante includ, de asemenea, de exemplu, proteine sau polipeptide în care unul sau mai multe resturi de aminoacizi sunt adăugate sau eliminate la capătul N- și/sau C-terminal. În general, o variantă are cel puțin aproximativ 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% sau cel puțin aproximativ 98% identitate de secvență de aminoacizi cu proteina sau polipeptida de secvență nativă. O variantă păstrează de preferință activitatea biologică, de ex. care leagă aceeași țintă, a proteinei sau polipeptidei pe care o derivă.

Termenul "variantă", așa cum este utilizat aici cu privire la ligand proteic corespunzător CD137 sau PD-L1 al unei proteine de fuziune din dezvoltare, se referă la CD137 sau PD-L1 sau, respectiv, fragment al acestuia, care are unul sau mai multe, cum ar fi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80 sau mai multe substituții, deleții și/sau inserții de aminoacizi în comparație cu secvența nativă a CD137 sau PD-L1 (CD137 sau PD-L1 de tip sălbatic), cum ar fi CD137 așa cum este depus cu UniProt Q07011 sau PD-L1 așa cum este depus cu UniProt Q9NZQ7 descrise aici. O variantă CD137 sau, respectiv, o variantă PD-L1, are de preferință o identitate de aminoacizi de cel puțin 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% sau 95% cu un CD137 sau PD-L1 de tip sălbatic. O variantă CD137 sau o variantă PD-L1 așa cum este descrisă aici păstrează capacitatea de a lega proteinele de fuziune specifice CD137 și PD-L1 așa cum este prezentat în setul de revendicări anexat.

Termenul "variantă", așa cum este utilizat aici cu privire la o muteină de lipocalină, se referă la o muteină de lipocalină sau un fragment al acesteia din dezvoltare, în care secvența are mutații, incluzând substituții, deleții și inserții și/sau modificări chimice. O variantă a muteinei de lipocalină așa cum este descrisă aici păstrează activitatea biologică, de exemplu, legarea la CD137, a muteinei de lipocalină din care aceasta este derivată. În general, o variantă de muteină de lipocalină are cel puțin aproximativ 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98% identitate de secvență de aminoacizi cu muteina de lipocalină din care aceasta e derivat.

Așa cum este utilizat aici, termenul "mutagenезă" se referă la introducerea de mutații într-o secvență de polinucleotidă sau aminoacizi. Mutațiile sunt introduse de preferință în condiții experimentale astfel încât aminoacidul care apare în mod natural la o poziție dată a secvenței proteinei sau polipeptidei poate fi alterat, de exemplu substituit cu cel puțin un aminoacid. Termenul "mutagenезă" include de asemenea modificarea (suplimentară) a lungimii segmentelor de secvență prin deleția sau inserarea unuia sau mai multor aminoacizi. Astfel, este în scopul dezvoltării că, de exemplu, un aminoacid la o poziție aleasă a secvenței este înlocuit cu o întindere de trei aminoacizi, conducând la adăugarea a două resturi de

aminoacizi în comparație cu lungimea segmentului respectiv. a proteinei native sau a secvenței polipeptidice de aminoacizi. O astfel de inserare sau deleție poate fi introdusă independent una de cealaltă în oricare dintre segmentele de secvență care pot fi supuse mutagenzei în descriere.

Așa cum este utilizat aici, termenul "mutagenză aleatorie" înseamnă că nu este prezentă nicio mutație predeterminată (alterarea aminoacidului) la o anumită poziție a secvenței, dar că cel puțin doi aminoacizi pot fi încorporați cu o anumită probabilitate la o poziție a secvenței predefinită în timpul mutagenzei.

Așa cum este utilizat aici, termenul "identitate de secvență" sau "identitate" denotă o proprietate a secvențelor care măsoară asemănarea sau relația lor. Termenul „identitate de secvență” sau „identitate” așa cum este utilizat în prezenta dezvăluire înseamnă procentul de resturi identice în funcție de perechi - în urma alinierii (omoloage) a unei secvențe a unei proteine sau polipeptide din dezvăluire cu o secvență în cauză - cu privire la numărul de reziduuri din cea mai lungă dintre aceste două secvențe. Identitatea secvenței este măsurată prin împărțirea numărului de resturi identice de aminoacizi la numărul total de resturi și înmulțirea produsului cu 100.

Așa cum este utilizat aici, termenul „omologie de secvență” sau „omologie” are semnificația sa obișnuită și aminoacidul omolog include aminoacizi identici, precum și aminoacizi care sunt considerați a fi substituții conservatoare la poziții echivalente în secvența liniară de aminoacizi a unei proteine sau polipeptide din dezvăluire (de exemplu, orice proteine de fuziune sau muteine de lipocalină din dezvăluire).

Un profesionist calificat va recunoaște programele de calculator disponibile, de exemplu BLAST (Altschul et al., Nucleic Acids Res, 1997), BLAST2 (Altschul et al., J Mol Biol, 1990), și Smith-Waterman (Smith și Waterman, J Mol Biol, 1981), pentru determinarea omologiei de secvență sau a identității secvenței folosind parametri standard. Procentul de omologie de secvență sau identitate de secvență poate fi determinat, de exemplu, aici folosind programul BLASTP, versiunea 2.2.5 (16 noiembrie 2002; (Altschul et al., Nucleic Acids Res, 1997). În acest exemplu care nu face parte din invenția revendicată, procentul de omologie se bazează pe alinierea întregii secvențe de proteină sau polipeptidă (matrice: BLOSUM 62; costuri de decalaj: 11,1; valoarea limită setată la 10^{-3}) incluzând secvențele de propeptidă, utilizând de preferință schela de proteine de tip sălbatic ca referință într-o comparație pe perechi. Se calculează ca procent al numărului de „pozitive” (aminoacizi omologi) indicat ca rezultat în rezultatul programului BLASTP împărțit la numărul total de aminoacizi selectați de program pentru aliniere.

În mod specific, pentru a determina dacă un rest de aminoacizi al secvenței de aminoacizi a unei muteine de lipocalină este diferit de o lipocalină de tip sălbatic care corespunde unei anumite poziții în secvența de aminoacizi a unei lipocaline de tip sălbatic, un specialist în domeniu poate utiliza mijloace și metode binecunoscute în domeniu, de exemplu, aliniamente, fie manual, fie prin utilizarea programelor de calculator, cum ar fi BLAST 2.0, care înseamnă Basic Local Alignment Search Tool, sau ClustalW, sau orice alt program adecvat care este adecvat pentru a genera alinieri de secvențe. În consecință, o secvență de tip sălbatic de lipocalină poate servi ca "secvență subiect" sau "secvență de referință", în timp ce secvența de aminoacizi a unei muteine de lipocalină diferită de lipocalină de tip sălbatic descrisă aici servește ca "secvență de interogare". Termenii „secvență de tip sălbatic”, „secvență de referință” și „secvență subiect” sunt utilizați în mod interschimbabil aici. O secvență preferată de lipocalină de tip sălbatic este secvența de hTLC așa cum este prezentată în SECV ID NR: 1 sau hNGAL așa cum este prezentat în SECV ID NR: 2.

„Lacunele” sunt spații dintr-o aliniere care sunt rezultatul adăugărilor sau eliminărilor de aminoacizi. Astfel, două copii ale exact aceleiași secvențe au identitate de 100%, dar secvențele care sunt mai puțin conservate și au deleții, adăugiri sau înlocuiri pot avea un grad mai scăzut de identitate a secvenței.

Așa cum este utilizat aici, termenul "poziție" înseamnă poziția fie a unui aminoacid într-o secvență de aminoacizi descrisă aici, fie poziția unei nucleotide într-o secvență de acid nucleic descrisă aici. Trebuie înțeles că atunci când termenul „corespunde” sau „corespunzător” așa cum este utilizat aici în contextul pozițiilor secvenței de aminoacizi a uneia sau mai multor muteine de lipocalină, o poziție corespunzătoare nu este determinată numai de numărul de nucleotide precedente sau aminoacizi. În consecință, poziția absolută a unui aminoacid dat în conformitate cu dezvăluirea poate varia față de poziția corespunzătoare datorită deleției sau adăugării de aminoacizi în altă parte într-o lipocalină (mutantă sau de tip sălbatic). În mod similar, poziția absolută a unei nucleotide date în conformitate cu prezenta dezvăluire poate varia față de poziția corespunzătoare din cauza delețiilor sau a nucleotidelor suplimentare în altă parte într-o regiune netranslatată (UTR) de muteină sau lipocalină de tip sălbatic 5', incluzând promotorul și/sau orice alte secvențe reglatoare sau gene (inclusiv exoni și introni).

O "poziție corespunzătoare" în conformitate cu dezvoltarea poate fi poziția secvenței care se aliniază la poziția secvenței căreia îi corespunde într-o aliniere a secvenței perechi sau multiplu conform prezentei dezvoltării. Este de preferat să se înțeleagă că, pentru o „poziție corespunzătoare”, în conformitate cu dezvoltarea, pozițiile absolute ale nucleotidelor sau aminoacizilor pot diferi de nucleotidele sau aminoacizii adiacenți, dar nucleotidele sau aminoacizii adiacente menționate ar putea fi schimbate, șterse, sau adăugate pot fi cuprinse din aceeași una sau mai multe "poziții corespunzătoare".

În plus, pentru o poziție corespunzătoare într-o muteină de lipocalină bazată pe o secvență de referință în conformitate cu dezvoltarea, este de preferat să se înțeleagă că pozițiile nucleotidelor sau aminoacizilor unei muteine de lipocalină pot corespunde structural cu pozițiile din altă parte dintr-o lipocalină de referință (lipocalină de tip sălbatic) sau o altă muteină de lipocalină, chiar dacă pot diferi în cifrele de poziție absolută, după cum apreciază specialiștii în lumina modelului general de pliere extrem de conservat dintre lipocaline.

Așa cum sunt utilizați în mod interschimbabil aici, termenii „conjugat”, „conjugare”, „fuzionare”, „fuziune” sau „legat” se referă la unirea a două sau mai multe subunități, prin toate formele de legătură covalentă sau necovalentă, prin mijloace care includ, dar fără a se limita la, fuziunea genetică, conjugarea chimică, cuplarea printr-un linker sau un agent de reticulare și asociere necovalentă.

Termenul "polipeptidă de fuziune" sau "proteină de fuziune" așa cum este utilizat aici se referă la o polipeptidă sau proteină care cuprinde două sau mai multe subunități. O proteină de fuziune așa cum este prezentată în setul de revendicări anexat cuprinde două sau mai multe subunități, cel puțin una dintre aceste subunități fiind capabilă să se lege în mod specific la CD137 și o altă subunitate capabilă să se lege în mod specific la PD-L1. În cadrul proteinei de fuziune, aceste subunități pot fi legate prin legătură covalentă sau necovalentă. De preferință, proteina de fuziune este o fuziune translațională între cele două sau mai multe subunități. Fuziunea translațională poate fi generată prin inginerie genetică a secvenței de codificare pentru o subunitate într-un cadru de citire cu secvența de codificare a unei alte subunități. Ambele subunități pot fi intercalate de o secvență de nucleotide care codifică un linker. Totuși, subunitățile unei proteine de fuziune din prezenta dezvoltare pot fi, de asemenea, legate prin conjugare chimică. Subunitățile care formează proteina de fuziune sunt legate în mod obișnuit unul de celălalt, capătul C-terminal al unei subunități la capătul N-terminal al altei subunități, sau capătul C-terminal al unei subunități la capătul C-terminal al altei subunități sau capătul N-terminal al unei subunități la N-terminal al altei subunități sau N-terminal al unei subunități la C-terminal al altei subunități. Subunitățile proteinei de fuziune pot fi legate în orice ordine și pot include mai mult de una dintre oricare dintre subunitățile constitutive. Dacă una sau mai multe subunități fac parte dintr-o proteină (complex) care constă din mai mult de un lanț polipeptidic, termenul „proteină de fuziune” se poate referi și la proteina care cuprinde secvențele fuzionate și toate celelalte lanțuri polipeptidice ale proteinei (complex). Ca exemplu ilustrativ, în care o imunoglobulină de lungime completă este fuzionată cu o muteină lipocalină printr-un lanț greu sau ușor al imunoglobulinei, termenul „proteină de fuziune” se poate referi la un singur lanț polipeptidic care cuprinde muteina de lipocalină și lanțul greu sau ușor al imunoglobulinei. Termenul "proteină de fuziune" se poate referi, de asemenea, la întreaga imunoglobulină (atât lanțurile ușoare, cât și cele grele) și muteina de lipocalină fuzionată la unul sau ambele lanțuri grele și/sau ușoare.

Așa cum este utilizat aici, termenul "subunitate" a unei proteine de fuziune dezvoltat aici se referă la o singură proteină sau un lanț polipeptidic separat, care poate forma o structură pliată stabilă de la sine și poate defini o funcție unică de furnizare a motivului de legare la o țintă.

Un "linker" care poate fi cuprins dintr-o proteină de fuziune conform prezentei dezvoltării unește împreună două sau mai multe subunități ale unei proteine de fuziune așa cum este descris aici. Legătura poate fi covalentă sau necovalentă. O legătură covalentă preferată este printr-o legătură peptidică, cum ar fi o legătură peptidică între aminoacizi. Un linker preferat este un linker peptidic. În consecință, într-o realizare preferată, respectivul linker cuprinde unul sau mai mulți aminoacizi, cum ar fi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sau mai mulți aminoacizi. Linkeri peptidici preferați sunt descriși aici, incluzând linkeri glicină-serină (GS), linkeri GS glicozilați și linkeri polimeri prolină-alanină-serină (PAS). În unele exemple de realizare preferate, un linker GS este un $(G_4S)_3$ așa cum este descris în SECV ID NR: 13 este utilizat pentru a uni subunitățile unei proteine de fuziune. Alți linkeri preferați includ linkeri chimici.

Așa cum este utilizat aici, termenul "albumină" include toate albuminele de mamifere cum ar fi albumina serică umană sau albumina serică bovină sau albumina serică de șobolan.

Așa cum este utilizat aici, termenul "moleculă organică" sau "moleculă organică mică" desemnează o moleculă organică care cuprinde cel puțin doi atomi de carbon, dar de preferință nu mai mult de 7 sau 12 legături de carbon rotative, având o greutate moleculară cuprinsă între 100 și 2.000 daltoni, de preferință între 100 și 1.000 daltoni și incluzând opțional unul sau doi atomi de metal.

O „probă” este definită ca o probă biologică prelevată de la orice subiect. Probele biologice includ, dar nu se limitează la, sânge, ser, urină, fecale, material seminal sau țesut, inclusiv țesut tumoral.

Un "subiect" este o vertebrată, de preferință un mamifer, mai preferabil un om. Termenul "mamifer" este folosit aici pentru a se referi la orice animal clasificat ca mamifer, incluzând, fără limitare, oameni, animale domestice și de fermă și animale de grădină zoologică, sport sau animale de companie, cum ar fi oi, câini, cai, pisici, vaci, șobolani, porci, maimuțe precum maimuțele cynomolgus, pentru a numi doar câteva exemple ilustrative. De preferință, "mamiferul" utilizat aici este uman.

O „cantitate eficientă” este o cantitate suficientă pentru a produce rezultate benefice sau dorite. O cantitate eficientă poate fi administrată în una sau mai multe administrări sau doze individuale.

Așa cum este utilizat aici, "anticorp" include anticorpi întregi sau orice fragment de legare la antigen (adică, "porțiune de legare la antigen") sau un singur lanț al acestora. Un anticorp întreg se referă la o glicoproteină care cuprinde cel puțin două lanțuri grele (HC) și două lanțuri ușoare (LC) interconectate prin legături disulfură. Fiecare lanț greu este compus dintr-un domeniu variabil al lanțului greu (V_H sau HCVR) și o regiune constantă a lanțului greu (C_H). Regiunea constantă a lanțului greu este compusă din trei domenii, C_{H1} , C_{H2} și C_{H3} . Fiecare lanț ușor este compus dintr-un domeniu variabil al lanțului ușor (V_L sau LCVR) și o regiune constantă a lanțului ușor (C_L). Regiunea constantă a lanțului ușor este compusă dintr-un domeniu, C_L . Regiunile V_H și V_L pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, numite regiuni determinante de complementaritate (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, numite regiuni cadru (FR). Fiecare V_H și V_L este compus din trei CDR și patru FR, aranjate în următoarea ordine de la capătul amino-terminal la capătul carboxi-terminal: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Regiunile variabile ale lanțurilor grele și ușoare conțin un domeniu de legare care interacționează cu un antigen (de exemplu, PD-L1). Regiunile constante ale anticorpilor pot media opțional legarea imunoglobulinei la țesuturi sau factori gazdă, incluzând diferite celule ale sistemului imunitar (de exemplu, celule efectoare) și prima componentă (C1q) a sistemului complement clasic.

Așa cum este utilizat aici, "fragmentul de legare la antigen" al unui anticorp se referă la unul sau mai multe fragmente ale unui anticorp care păstrează capacitatea de a se lega în mod specific la un antigen (de exemplu, PD-L1). S-a demonstrat că funcția de legare a antigenului a unui anticorp poate fi realizată de fragmente ale unui anticorp de lungime completă. Exemplele de fragmente de legare cuprinse în termenul „fragment de legare la antigen” al unui anticorp includ (i) un fragment Fab constând din domenii V_H , V_L , C_L și C_{H1} ; (ii) un fragment $F(ab')_2$ cuprinzând două fragmente Fab legate printr-o punte disulfurică în regiunea balama; (iii) un fragment Fab' constând din domeniile V_H , V_L , C_L și C_{H1} și regiunea dintre domeniile C_{H1} și C_{H2} ; (iv) un fragment Fd constând din domenii V_H și C_{H1} ; (v) un fragment Fv cu un singur lanț constând din domenii V_H și V_L ale unui singur braț al unui anticorp, (vi) un fragment dAb (Ward și colab., Nature, 1989) constând dintr-un domeniu V_H ; și (vii) o regiune de determinare a complementarității izolată (CDR) sau o combinație de două sau mai multe CDR izolate care pot fi unite opțional printr-un linker sintetic; (viii) un „diabody” care cuprinde V_H și V_L conectate în același lanț polipeptidic folosind un linker scurt (a se vedea, de exemplu, documentele de brevet EP 404,097; WO 93/11161; și Holliger și colab., Proc Natl Acad Sci U S A, 1993); (ix) un „fragment de anticorp de domeniu” care conține numai V_H sau V_L , unde în unele cazuri două sau mai multe regiuni V_H sunt unite covalent.

Anticorpii pot fi policlonali sau monoclonali; xenogeneice, alogen sau singeneice; sau forme modificate ale acestora (de exemplu, umanizate, himerice sau multispecifice). Anticorpii pot fi, de asemenea, complet umani.

Așa cum este utilizat aici, "cadru" sau "FR" se referă la resturile domeniului variabil, altele decât resturile regiunii hipervariabile (CDR).

"Regiune cristalizabilă fragment" sau "regiune Fc" se referă la regiunea C-terminală a unui lanț greu de imunoglobulină, incluzând regiuni Fc cu secvență nativă și regiuni Fc variante. Deși limitele regiunii Fc ale unui lanț greu de imunoglobulină pot varia, regiunea Fc a lanțului greu al IgG uman este de obicei definită ca să se întindă de la un rest de aminoacid în poziția Cys226, sau de la Pro230, la capătul carboxil-terminal al acestuia, numerotarea conform cu Indicele UE al Kabatului (Johnson și Wu, Nucleic Acids Res, 2000). Lizina C-terminală (reziduul 447 conform indicelui EU al Kabat) din regiunea Fc poate fi îndepărtată, de exemplu, în timpul producerii sau purificării anticorpului, sau prin inginerie recombinată a acidului nucleic care codifică un lanț greu al anticorpului. În consecință, o compoziție de anticorpi intacti poate cuprinde populații de anticorpi cu toate resturile K447 îndepărtate, populații de anticorpi fără resturi K447 îndepărtate și populații de anticorpi având un amestec de anticorpi cu și fără restul K447.

"Receptor Fc" sau "FcR" se referă la un receptor care se leagă la regiunea Fc a unui anticorp.

Așa cum este utilizat aici, "anticorp izolat" se referă la un anticorp care este substanțial lipsit de mediul său natural. De exemplu, un anticorp izolat este în mod substanțial lipsit de material celular și alte proteine din celula sau sursa de țesut din care este derivat. Un "anticorp izolat" se referă în plus la un anticorp care este substanțial lipsit de alți anticorpi având specificități antigenice diferite. În cazul de față, un anticorp izolat care se leagă în mod specific PD-L1 este în mod substanțial lipsit de anticorpi care leagă în mod specific antigeni alții decât PD-L1. Cu toate acestea, un anticorp izolat care leagă în mod specific PD-L1 poate avea reactivitate încrucișată cu alți antigeni, cum ar fi moleculele PD-L1 de la alte specii.

Așa cum este utilizat aici, "anticorp monoclonal" se referă la o preparare de molecule de anticorp cu o singură compoziție moleculară. O compoziție de anticorp monoclonal prezintă o singură specificitate de legare și afinitate pentru un anumit epitop.

Așa cum este utilizat aici, "anticorp umanizat" se referă la un anticorp care constă din CDR de anticorpi derivați de la mamifere, altele decât umane, și regiunea FR și regiunea constantă a unui anticorp uman sau derivată dintr-un anticorp uman. Termenul "agent terapeutic" sau "agent terapeutic activ", așa cum este utilizat aici, se referă la un agent care este util din punct de vedere terapeutic. Un agent terapeutic poate fi orice agent pentru prevenirea, ameliorarea sau tratamentul unei boli, a unei stări fiziologice, a unui simptom sau pentru evaluarea sau diagnosticarea acestora.

Așa cum este utilizat aici, "anticorp uman" include anticorpi având regiuni variabile în care atât regiunile cadru cât și regiunile CDR sunt derivate din secvențe de imunoglobulină germinativă umană. Mai mult, dacă anticorpii conțin o regiune constantă, regiunea constantă este, de asemenea, derivată din secvențele de imunoglobuline ale liniei germinale umane. Cu toate acestea, termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, nu este destinat să includă anticorpi în care secvențele CDR derivate din linia germinativă a unei alte specii de mamifere, cum ar fi un șoarece, au fost grefate pe secvențe cadru umane.

III. DESCRIEREA FIGURILOR

Figura 1: oferă o privire de ansamblu asupra designului proteinelor de fuziune reprezentative descrise în această cerere care sunt bispecifice pentru țintele CD137 și PD-L1. Proteinele de fuziune reprezentative au fost realizate pe baza unui anticorp specific pentru PD-L1 (de exemplu, un anticorp prin care lanțurile grele sunt furnizate prin SECV ID NR: 86, sau cuprind un domeniu variabil al lanțului greu al SECV ID NR: 77, sau cuprind secvențele CDR ale GFSLSNYD (HCDR1, SECV ID NR: 60), IWTGGAT (HCDR2, SECV ID NR: 61) și VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3; SECV ID NR: 62) și lanțurile ușoare sunt furnizate de SECV ID NR: 87 sau cuprind un material greu, domeniul variabil de lanț al SECV ID NR: 82 sau cuprind secvențele CDR ale QSIGTN (LCDR1, SECV ID NR: 63), YAS (LCDR2) și QQSNSWPYT (LCDR3; SECV ID NR: 64)) și una sau mai multe muteine de lipocalină specifice pentru CD137 (de exemplu, muteina de lipocalină din SECV ID NR: 42). Una sau mai multe muteine de lipocalină au fost fuzionate genetic la capătul C și/sau N-terminal fie al lanțului greu, fie al lanțului ușor al unui anticorp specific PD-L1, așa cum este descris în **Figura 1A-1I**, rezultând proteinele de fuziune, de exemplu, SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91. Proteinele de fuziune generate pot fi bivalente cu CD137 (de exemplu, așa cum este descris în **Figura 1A-1D**), sau tetravalent la CD137 (de exemplu, așa cum este descris în **Figura 1E-1H**), sau au o valență și mai mare pentru CD137 (de exemplu, așa cum este descris în **Figura 1I**). Proteinele de fuziune monospecifice suplimentare au fost generate prin fuzionarea uneia sau mai multor muteine de lipocaline specifice CD137 (de exemplu, așa cum este descris în **Figura 1J-1K**) la capătul C-terminal al regiunii Fc a unui anticorp furnizat așa cum este descris aici printr-un linker peptidic. Proteinele de fuziune monospecifice rezultate sunt furnizate, de exemplu, în SECV ID NR: 88 și SECV ID NR: 89.

Figura 2: arată rezultatele experimentelor ELISA în care legarea la PD-L1 sau CD137 a proteinelor de fuziune reprezentative a fost determinată așa cum este descris în **Exemplul 4**. PD-L1 sau CD137 (cu eticheta C-terminală His sau Fc) au fost acoperite pe o placă de microtitrare, iar agenții testați au fost titrați începând cu cea mai mare concentrație de 100 nM. Agenții legați aflați în studiu au fost detectați prin intermediul Fc-HRP anti-IgG uman sau, respectiv, anti-NGAL-HRP. Datele au fost potrivite cu un model de legare 1:1 cu valoarea EC_{50} și semnalul maxim ca parametri liberi și o pantă care a fost fixată la unu. Valorile CE_{50} rezultate sunt furnizate în **Tabelul 4**.

Figura 3: ilustrează rezultatele unui experiment ELISA în care capacitatea proteinelor reprezentative de fuziune de a lega simultan ambele ținte, PD-L1 și CD137, a fost determinată așa cum este descris în **Exemplul 5**. HuPD-L1-His recombinant sau huCD137-His a fost acoperit pe o placă de microtitrare, urmată de o titrare a proteinelor de fuziune începând cu cea mai mare concentrație de 100 nM. Ulterior, a fost adăugată o concentrație constantă de huCD137-His biotilnat sau, respectiv, huPD-L1-His biotilnat, care a fost detectată prin ExtrAvidin-Peroxidază.

Figura 4: arată rezultatele unei evaluări a legării țintă a proteinelor de fuziune prin citometrie în flux folosind CD137 uman sau cynomolgus (**Figura 4A-4B**), precum și PD-L1 uman sau cynomolgus (**Figura 4C-4D**) care exprimă celule Flp-In-CHO așa cum este descris în **Exemplul 6**. Nu s-a observat nicio legare la utilizarea celulelor Flp-In-CHO transfectate simulat (**Figura 4E**). Mijloacele geometrice ale intensității fluorescenței au fost utilizate pentru a calcula valorile EC_{50} utilizând regresia neliniară (fond comun, SLOPE = 1). Valorile EC_{50} sunt furnizate în **Tabelul 6**.

Figura 5: arată legarea proteinelor de fuziune la celulele tumorale PD-L1- pozitive evaluate folosind citometrie în flux prin incubarea celulelor RKO și a proteinelor de fuziune așa cum este descris în **Exemplul 7**.

Figura 6: oferă exemple de experiment bazat pe SPR cu legare multiplă conceput pentru a investiga dacă interacțiunile proteinei de fuziune cu CD137 sunt împiedicate de legarea CD137L la CD137, așa cum este descris în **Exemplul 8**. Acest lucru este evaluat prin generarea unui complex de huCD137 (fuziune C-terminal Fc) și huCD137L (cu o etichetă His C-terminal) pe cipul senzorului SPR și verificând dacă proteinele de fuziune mai pot lega complexul huCD137 și CD137L. Ca referință, huCD137 în absența huCD137L este, de asemenea, incubat cu proteinele de fuziune testate. Urma SPR pentru legarea proteinei de fuziune respective la huCD137 singur este marcată cu o săgeată cu o tulpină solidă. Urma SPR pentru legarea proteinei de fuziune respective la huCD137 care a fost saturat cu huCD137L este marcată cu o săgeată cu o tulpină ruptă. Ca martori, au fost utilizate injecții martor fără proteine de fuziune. Experimentul arată că toate proteinele de fuziune testate au fost capabile să lege CD137 în prezența CD137L.

Figura 7: arată că proteinele de fuziune concurează cu PD-L1 pentru legarea la PD-1, descrise în studiile ELISA competitive, așa cum este descris în **Exemplul 9**. O concentrație constantă de huPD-1-His a fost acoperită pe o placă de microtitrare, urmată de adăugarea unui amestec de molecule de testare la diferite concentrații și trasor huPD-L1-Fc la o concentrație fixă. Trasorul legat a fost detectat utilizând un anticorp anti-IgG Fc marcat cu HRP. S-a observat inhibarea dependentă de doză a legării huPD-L1-Fc la PD-1 de către proteinele de fuziune bispecifice CD137 și PD-L1 sau anticorpii specifici PD-L1.

Figura 8: Potențialul proteinelor de fuziune reprezentative de a co-stimula activarea celulelor T într-o manieră dependentă de țintă PD-L1 a fost evaluat utilizând un biotest CD137. Celulele Jurkat NFkB-luc2/CD137 au fost co-cultivate cu linia celulară tumorală RKO care exprimă PD-L1 în prezența diferitelor concentrații ale proteinelor de fuziune sau martorilor. După 4 ore, s-a adăugat reactiv de testare a luciferazei și au fost măsurate semnalele luminescente. Analiza curbei logistice cu patru parametri a fost efectuată cu GraphPad Prism® pentru a calcula valori EC_{50} (vezi **Tabelul 9**). Proteinele de fuziune co-stimulează doar activarea celulelor T în prezența PD-L1 (**Figura 8A și 8C**) dar nu în absența PD-L1 (**Figura 8B și 8D**). În contrast, mAb anti-CD137 de referință (SECV ID NR: 28 și 29) prezintă o activare similară în prezența și absența celulelor RKO pozitive PD-L1.

Figura 9: prezintă rezultatele unui experiment reprezentativ în care a fost investigată capacitatea proteinelor de fuziune selectate de a induce activarea celulelor T. Anticorpii PD-L1, inclusiv blocul de construcție al anticorpului PD-L1 respectiv, muteinele de lipocalină care leagă CD137 ca fuziuni Fc și un anticorp de referință anti-CD137 au fost testați singuri și în combinație ca un cocktail anti-PD-L1/anti-CD137. În experiment, celulele mononucleare din sângele periferic uman (PBMC) au fost incubate cu proteine de fuziune, anticorpi, fuziuni cu lipocalină muteină Fc, cocktailuri sau control în prezența a 1 ng/mL enterotoxină B stafilococică (SEB). Nivelurile de interleukină 2 secretată (IL-2), care reflectă activarea celulelor T, au fost determinate printr-un test bazat pe electrochimiluminiscență ca citire pentru activarea celulelor T și normalizate la nivelurile de control IgG4 corespunzător, așa cum este descris în **Exemplul 11**. Toate proteinele de fuziune sunt capabile de a induce activarea celulelor T și sunt mai puternic sau cel puțin comparabile cu blocurile de construcție individuale sau un cocktail de anticorpi de referință anti-PD-L1/anti-CD137.

Figura 10: arată capacitatea proteinelor de fuziune reprezentative de a co-stimula activarea celulelor T într-o manieră dependentă de țintă PD-L1. Anticorpii PD-L1, inclusiv blocul de construcție al anticorpului PD-L1 respectiv, muteinele de lipocalină care leagă CD137 ca fuziuni Fc și un anticorp de referință anti-CD137 au fost testați singuri și în combinație ca un cocktail anti-PD-L1/anti-CD137. Diverse linii de celule tumorale care exprimă diferite niveluri de PD-L1 (Ridicat: RKO; Moderat: HCC827; Negativ: HepG) au fost însămânțate în plăci acoperite cu CD3 anti-uman. Celulele Pan T și diferite concentrații de proteine de fuziune și blocuri de construcție unice au fost adăugate și incubate timp de 3 zile. Nivelurile de IL-2 secretată au fost determinate printr-un test bazat pe electrochimiluminiscență, așa cum este descris în **Exemplul 12**. Toate proteinele de fuziune sunt capabile să crească secreția de IL-2 într-o manieră dependentă de PD-L1.

Figura 11: ilustrează stabilitatea de depozitare a proteinelor de fuziune în PBS sau histidină 25 mM, NaCl 60 mM, arginină 200 mM pH 6 după incubare de 1, 2, 3 sau 4 săptămâni la 37°C sau 40°C la

concentrația de 1 mg/ml sau 20 mg/ml. Stabilitatea este evaluată prin recuperarea monomerilor din excluderea mărimii analitice sau prin recuperarea proteinelor funcționale din ELISA cantitativ, așa cum este descris în **Exemplul 13**.

Figura 12: arată capacitatea unei proteine de fuziune reprezentative (SECV ID NR: 90 și 87) de a stimula secreția de IL-2 într-o reacție limfocitară mixtă (MLR) cu celulele T CD4⁺. Proteinele de fuziune, blocul de construcție a anticorpului PD-L1 (SECV ID NR: 86 și 87), muteina de lipocalină care leagă CD137 ca fuziune Fc (SECV ID NR: 89) și un anticorp de referință anti-CD137 sau anticorpul de referință anti-PD-L1 singur sau în combinație ca cocktail anti-PD-L1/anti-CD137, au fost testați la concentrații echimolare, așa cum este descris în **Exemplul 14**. Secreția de IL-2 a fost măsurată în supernatanți după 6 zile de incubare cu toate celulele T umane CD4⁺ și celulele dendritice derivate din monocite (moDC) de la diferiți donatori sănătoși. **Figura 12A** ilustrează faptul că proteina de fuziune SECV ID NR: 90 și 87 a prezentat o creștere semnificativă a secreției de IL-2 în comparație cu blocul de construcție singur (anticorpul PD-L1 SECV ID NR: 86 și 87 sau CD137 muteină de lipocalină specifică SECV ID NR: 89) și un anticorp de referință anti-PD-L1 sau anti-CD137 (SECV ID NR: 26 și 27 sau SECV ID NR: 28 și respectiv 29), la concentrații echimolare (echivalent cu 10 sau 0,1 μg/ml de proteină de fuziune testată). Sunt prezentate date din 8 experimente independente. **Figura 12B** prezintă proteina de fuziune SECV ID NR: 90 și 87 a fost capabilă să inducă o secreție dependentă de doză de IL-2, peste concentrații variind de la 0,001 la 20 μg/mL. Nivelurile IL-2 induse de proteina de fuziune au fost mai mari în comparație cu concentrațiile echimolare ale cocktail-ului unui anticorp de referință anti-PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27) și un anticorp de referință anti-CD137 (SECV ID NR: 28 și 29). Sunt afișate date de la un donator reprezentativ.

Figura 13: prezintă capacitatea unei proteine de fuziune exemplificative (SECV ID NR: 90 și 87) de a induce secreția de molecule efectoare de celule T CD8⁺. Proteina de fuziune a fost cultivată cu moDC și celule T CD8⁺ de la donatori sănătoși nepotriviți timp de 6 zile, după care secreția de IL-2 și molecule efectoare de celule T CD8⁺ din supernatanți au fost cuantificate utilizând un test Luminex așa cum este descris în **Exemplul 15**. Proteina de fuziune SECV ID NR: 90 și 87 a arătat o creștere a secreției de IL-2 și a factorilor citotoxici (perforină, granzima B și granzima A) la 10 μg/mL, în comparație cu anticorpul de referință anti-PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27) și anticorpul de referință anti-CD137 (SECV ID NR: 28 și 29) atunci când este utilizat singur sau ca cocktail.

Figura 14: arată că proteinele de fuziune leagă epitopii suprapusi cu un anticorp CD137 activ clinic (SECV ID NR: 28 și 29), descris în studiile ELISA competitive așa cum este descris în **Exemplul 17**. O concentrație constantă de SECV ID NR: 28 și 29 a fost acoperită pe o placă de microtitrare, urmată de adăugarea unui amestec de molecule de testare la diferite concentrații și a traserului de huCD137-Fc biotinitat la o concentrație fixă. Traserul legat a fost detectat prin ExtrAvidin-Peroxidase. Proteinele de fuziune concurează cu anticorpul CD137 pentru legarea CD137.

Figura 15: arată potențialul proteinelor de fuziune reprezentative de a bloca semnalul inhibitor mediat de interacțiunea PD-1/PD-L1, evaluat folosind un test biologic de blocare PD-1/PD-L1, așa cum este descris în **Exemplul 18**. Celulele Jurkat T PD-1-NFAT-luc (o linie de celule Jurkat care exprimă PD-1 și o genă de luciferază mediată de NFAT sub controlul promotorului NFAT) au fost co-cultivate cu celule PD-L1 aAPC/CHO-K1 în prezența diferitelor concentrații ale moleculelor de testare. După 6 ore, s-a adăugat reactiv de testare a luciferazei și s-au măsurat semnalele luminescente. Semnalul de fundal este de celule T Jurkat PD-1-NFAT-luc co-cultivate doar cu celule PD-L1 aAPC/CHO-K1. Proteina de fuziune a SECV ID NR: 90 și 87 blochează calea PD-1/PD-L1, comparabilă cu anticorpii PD-L1 testați, inclusiv anticorpul PD-L1 din blocul de construcție prezentat în SECV ID NR: 86 și 87 și anticorpul de referință PD-L1 prezentat în SECV ID NR: 26 și 27.

Figura 16: arată capacitatea unei proteine de fuziune reprezentative de a induce activarea celulelor T. Blocul de construcție al anticorpului PD-L1 și un anticorp de referință CD137, atunci când sunt utilizate singuri și în combinație cu un anticorp PD-L1, au fost de asemenea testate. În experiment, PBMC-urile umane au fost incubate cu proteina de fuziune, anticorpi, cocktailuri sau control în prezența a 0,1 ng/mL SEB. Nivelurile de IL-2 secretate au fost determinate printr-un test bazat pe electrochimiluminiscentă ca citire pentru activarea celulelor T, așa cum este descris în **Exemplul 19** și înfățișat în **Figura 16A**. **Figura 16B** afișează creșterea de ori a nivelurilor de secreție de IL-2 induse de moleculele de testare în comparație cu nivelul de secreție de fond de IL-2 (PBMC stimulate cu 0,1 ng/mL SEB și fără molecule de testare). Proteina de fuziune duce la o creștere dependentă de doză a secreției de IL-2, care este mai puternică decât un anticorp PD-L1 sau un anticorp CD137 singur sau în combinație.

Figura 17: demonstrează capacitatea unei proteine de fuziune reprezentative de a co-stimula activarea celulelor T în prezența PD-L1. Blocul de construcție al anticorpului PD-L1, un anticorp de referință CD137 și un cocktail de anticorp CD137 și un anticorp de referință PD-L1 au fost testate în paralel. Celulele CHO fie transfectate cu PD-L1 uman (**Figura 17A**) sau transfectat simulat (negativ PD-L1

uman, **Figura 17B**) au fost însămânțate în plăci acoperite cu anti-CD3 anti-uman. Celulele Pan T, precum și diferite concentrații de molecule de testare au fost adăugate și incubate timp de 2 zile. Nivelurile de IL-2 secretată în supernatant au fost determinate printr-un test bazat pe electrochimiluminiscență, așa cum este descris în **Exemplul 20**. Nivelurile de secreție de IL-2 au fost normalizate la nivelurile de fond (celule Pan T + celule anti-CD3 + celule CHO) pentru a descrie creșterea de ori a secreției de IL-2 în prezența celulelor CHO care exprimă PD-L1 uman (**Figura 17C**) sau celule CHO transfectate simulate (**Figura 17D**). Proteina de fuziune induce o creștere puternică dependentă de doză a secreției de IL-2 numai în prezența PD-L1, mai puternic decât anticorpii de referință CD137 singuri sau în combinație cu anticorpii de referință PD-L1.

Figura 18: furnizează rezultatul analizelor farmacocinetice ale proteinelor de fuziune bispecifice și ale anticorpului PD-L1 (SECV ID NR: 86 și 87) la șoareci, așa cum este descris în **Exemplul 21**. Șoarecii masculi CD-1 (3 șoareci per punct de timp) au fost injectați intravenos cu proteine de fuziune la o doză de 10 mg/kg. Nivelurile de medicamente au fost detectate utilizând un Sandwich ELISA care detectează molecula completă prin intermediul țințelor PD-L1 și CD137. Nivelurile plasmatice de anticorpi anti-PD-L1 au fost determinate utilizând un Sandwich ELISA cu țințe PD-L1 și Fc uman.

Figura 19: furnizează rezultatele unei analize farmacocinetice a unei proteine de fuziune reprezentative (SECV ID NR: 90 și 87) în comparație cu două proteine de fuziune care leagă CD137 și PD-L1 descrise anterior (SECV ID NR: 147 și SECV ID NR: 148) la șoareci așa cum este descris în **Exemplul 22**. Șoarecii masculi CD-1 (2 șoareci per punct de timp) au fost injectați intravenos cu molecule de testare la o doză de 2 mg/kg. Nivelurile de medicamente au fost detectate utilizând ELISA la momentele de timp indicate. Datele au fost reprezentate într-un grafic timp vs concentrație. SECV ID NR: 90 și 87 descrie aici, dar nu SECV ID NR: 147 sau SECV ID NR: 148, prezintă un profil farmacocinetic favorabil sau o farmacocinetică asemănătoare anticorpului.

IV. DESCRIEREA DETALIATĂ A DEZVĂLUIRII

Așa cum este descris aici, prezenta dezvoltare cuprinde recunoașterea faptului că un liant CD137 bivalent, cum ar fi un anticorp, poate să nu fie suficient în sine pentru a grupa CD137 pe celulele T sau pe celulele NK și să conducă la activare eficientă, similar cu lipsa de activitate a CD137L solubil trivalent. În publicațiile recente care utilizează modele preclinice de șoarece, au fost prezentate *in vivo* dovezi că modul de acțiune al altor anticorpi anti-TNFR necesită interacțiunea anticorpilor prin intermediul părții lor Fc cu receptorii Fc-gamma pe celulele care exprimă receptorii Fc-gamma (Bulliard și colab., Immunol Cell Biol, 2014, Bulliard și colab., J Exp Med, 2013). Modul de acțiune al acestor anticorpi anti-TNFR poate fi, prin urmare, dominat de o grupare neîntințită prin intermediul receptorilor Fc-gamma, în funcție de prezența celulelor care exprimă receptorii Fc-gamma, care nu se pot supraexprima neapărat în micromediul tumoral vizat ca comparativ cu tesuturile normale.

Astfel, există o nevoie nesatisfăcută pentru generarea de medicamente care grupează și activează CD137 cu un mod de acțiune specific, țințit către tumoră.

Pentru a satisface această nevoie nesatisfăcută, prezenta dezvoltare oferă, printre altele, noi abordări pentru angajarea simultană a CD137 și PD-L1 prin una sau mai multe proteine de fuziune având specificitate de legare pentru CD137 și specificitate de legare pentru PD-L1. Proteinele de fuziune furnizate sunt concepute pentru a promova gruparea CD137 prin legarea celulelor T CD137-pozitive cu PD-L1 exprimat în micromediul tumoral. Astfel de molecule bispecifice pot combina activarea și expansiunea celulelor T induse de CD137 cu blocarea punctului de control imun mediată de anti-PD-L1 și astfel pot depăși anumite limitări ale terapiei cu un singur agent și pot oferi beneficii, de exemplu, pacienților rezistenți sau neresponsivi. Proteinele de fuziune sunt, de asemenea, concepute pentru a oferi potențiale terapii combinatorii într-o moleculă și, în același timp, permit inducerea localizată a celulelor T specifice antigenului în micromediul tumoral, reducând potențial toxicitatea periferică.

În unele aspecte, prezenta dezvoltare furnizează proteine de fuziune care leagă CD137 și PD-L1, precum și metode și aplicații utile pentru acestea. Dezvoltarea furnizează, de asemenea, metode de producere a proteinelor de fuziune de legare a CD137 și PD-L1 descrise aici, precum și compoziții care cuprind astfel de proteine. Proteinele de fuziune care leagă CD137 și PD-L1 din dezvoltare, precum și compozițiile acestora pot fi utilizate în metode de detectare a CD137 și/sau PD-L1 într-o probă, în metode de legare a CD137 și/sau PD-L1 la un subiect, sau în metode de modulare a răspunsurilor imune la un subiect. Nu au fost descrise anterior astfel de proteine de fuziune având aceste caracteristici asociate utilizărilor furnizate de prezenta dezvoltare. Spre deosebire de proteinele de fuziune furnizate aici, proteinele de fuziune cunoscute anterior care vizează atât CD137, cât și PD-L1 au suferit de una sau mai multe farmacocinetici slabe, un grad inacceptabil de legare în afara țintei, capacitatea redusă sau degradată în alt mod de a se lega la unul sau ambele ținte ale unei anumite proteine de fuziune (de exemplu, PD-L1 și/sau CD137) și/sau un grad inacceptabil de activare nespecifică (de exemplu, PD-L1 independentă) a, de exemplu, a sistemului imunitar.

A. Exemple de proteine de fuziune specifice pentru CD137 și PD-L1 din dezvoltare.

Prezenta invenție se referă la o proteină de fuziune care este capabilă să lege atât CD137, cât și PD-L1, în care proteina de fuziune cuprinde două subunități, în care prima subunitate cuprinde o imunoglobulină de lungime completă care este specifică pentru PD-L1 și în care a doua subunitate cuprinde o muteină de lipocalină care este specifică pentru CD137, în care proteina de fuziune cuprinde secvențe de aminoacizi având cel puțin 90% identitate de secvență cu secvențele de aminoacizi prezentate în SECV ID NR: 90 și 87, în care lanțul greu al imunoglobulinei cuprinde următorul set de secvențe CDR: GFSLSNYD (HCDR1, SECV ID NR: 60), IWTGGAT (HCDR2, SECV ID NR: 61) și VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3, SECV ID NR: 62) și lanțul ușor al imunoglobulinei cuprinde următorul set de secvențe CDR: QSIGTN (LCDR1, SECV ID NR: 63), YAS (LCDR2) și QQSNSWPYT (LCDR3, SECV ID NR: 64), și în care secvența de aminoacizi a muteinei de lipocalină cuprinde următorul set de aminoacizi mutați reziduuri în comparație cu secvența polipeptidică liniară a hNGAL matur (așa cum se arată în SECV ID NR: 2): Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; și Lys 134 → Tyr. O proteină de fuziune furnizată conform setului de revendicări anexat conține cel puțin două subunități: (1) o primă subunitate care cuprinde o imunoglobulină de lungime completă specifică pentru PD-L1 și (2) o a doua subunitate care cuprinde o muteină de lipocalină specifică pentru CD137.

În unele exemple de realizare, cel puțin o subunitate poate fi legată la o altă subunitate prin intermediul unui linker. În unele realizări suplimentare, un linker este un linker peptidic, de exemplu, un linker glicină-serină (GS) nestructurat, un linker GS glicozilat sau un linker polimer prolină-alanină-serină (PAS). În unele exemple de realizare, un linker GS este un linker $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ ($(\text{G}_4\text{S})_3$) așa cum se arată în SECV ID NR: 13. Alți linkeri exemplificatori sunt prezentați în SECV ID NR: 14-23. În unele exemple de realizare, un linker peptidic poate avea de la 1 la 50 de aminoacizi, cum ar fi 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 sau 50 de aminoacizi. De exemplu, atunci când o primă subunitate cuprinde o imunoglobulină de lungime completă, o a doua subunitate poate fi legată printr-un linker peptidic între capătul N-terminal al celei de-a doua subunități și capătul C-terminal al unei regiuni constante a lanțului greu (CH) a imunoglobulinei menționate.

În general, o subunitate poate fi fuzionată la capătul său N-terminal și/sau la capătul său C-terminal la o altă subunitate.

În unele exemple de realizare, în ceea ce privește o proteină de fuziune conform dezvoltării, în care cel puțin o subunitate poate fi sau cuprinde o imunoglobulină de lungime completă, funcția Fc a regiunii Fc a imunoglobulinei de lungime completă la celula pozitivă pentru receptorul Fc poate fi conservată în același timp în timp ce proteina de fuziune angajează simultan CD137 și PD-L1.

În unele exemple de realizare, în care cel puțin o subunitate a unei proteine de fuziune furnizate poate fi sau cuprinde o imunoglobulină de lungime completă, funcția Fc a regiunii Fc a imunoglobulinei de lungime completă la celula pozitivă pentru receptorul Fc poate fi redusă sau complet suprimată prin ingineria proteinelor în timp ce proteina de fuziune angajează simultan CD137 și PD-L1. În unele exemple de realizare, acest lucru poate fi realizat, de exemplu, prin trecerea de la scheletul IgG1 la IgG4, deoarece se știe că IgG4 prezintă interacțiuni reduse ale receptorului Fc-gamma în comparație cu IgG1. În unele exemple de realizare, pentru a reduce în continuare legarea reziduală la receptorii Fc-gamma, pot fi introduse mutații în scheletul IgG4, cum ar fi F234A și L235A. În unele exemple de realizare, o mutație S228P poate fi, de asemenea, introdusă în coloana vertebrală IgG4 pentru a minimiza schimbul de semi-anticorp IgG4 (Silva și colab., J Biol Chem, 2015). În unele realizări, pot fi introduse mutații F234A și L235A pentru scăderea ADCC și ADCCP (Glaesner și colab., Diabetes Metab Res Rev, 2010) și/sau mutații M428L și N434S sau mutații M252Y, S254T și T256E pentru timpul de înjumătățire plasmatică extins (Dall'Acqua și colab., J Biol Chem, 2006, Zalevsky și colab., Nat Biotechnol, 2010). În unele realizări, o mutație suplimentară N297A poate fi prezentă în lanțul greu al imunoglobulinei a proteinei de fuziune pentru a îndepărta motivul natural de glicozilare.

În unele variante de realizare, porțiunea Fc a unei imunoglobuline inclusă într-o proteină de fuziune a descrierii poate contribui la menținerea nivelurilor serice ale proteinei de fuziune. De exemplu, atunci când porțiunea Fc se leagă de receptorii Fc de pe celulele endoteliale și fagocite, proteina de fuziune poate fi internalizată și reciclată înapoi în fluxul sanguin, sporind timpul de înjumătățire al acestuia în organism.

Într-un aspect, proteinele de fuziune ale dezvoltării leagă CD137 cu afinitate ridicată. Într-un alt aspect, proteinele de fuziune furnizate leagă PD-L1 cu afinitate ridicată. În unele variante de realizare preferate, proteinele de fuziune prevăzute leagă simultan CD137 și PD-L1. În unele exemple de realizare,

legarea simultană la CD137 și PD-L1 permite proteinelor de fuziune furnizate să prezinte un răspuns durabil anti-tumoral sau anti-infecție.

În unele exemple de realizare, o proteină de fuziune furnizată cuprinde secvențele de aminoacizi prezentate în SECV ID NR: 90 și 87.

5 În unele exemple de realizare, o proteină de fuziune furnizată cuprinde secvențele de aminoacizi având cel puțin 92%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau chiar mai mare identitate de secvență cu secvențele de aminoacizi prezentate în SECV ID NR.: 90 și 87.

B. Exemple de imunoglobuline incluse în proteinele de fuziune.

10 O proteină de fuziune așa cum este prezentată în setul de revendicări anexat cuprinde o primă subunitate care cuprinde o imunoglobulină de lungime completă specifică pentru PD-L1. În unele exemple de realizare, o imunoglobulină, de exemplu, poate fi IgG1, IgG2 sau IgG4. În unele variante de realizare, o imunoglobulină este sau cuprinde IgG4.

15 Exemple ilustrative de anticorpi de legare a PD-L1 din dezvăluire pot cuprinde o regiune de legare a antigenului care blochează sau se leagă la același epitop ca un anticorp de legare a PD-L1 care cuprinde domeniul variabil al lanțului greu (V_H) și domeniul variabil al lanțului ușor (V_L) regiuni ale unui anticorp cunoscut, cum ar fi atezolizumab (cunoscut și ca MPDL3280A sau RG7446, denumire comercială Tecentriq[®]), avelumab (cunoscut și ca MSB0010718C, denumire comercială Bavencio[®]), durvalumab (cunoscut anterior ca MEDI4736, denumire comercială Imfinzi[®]) și BMS-936559 (cunoscut și ca MDX-1105), 5C10 (inclusiv 5C10 umanizat), 5F10 (inclusiv 5F10 umanizat) și 9F6 (inclusiv 9F6 umanizat).

20 În unele exemple de realizare, perechea de lanț greu și de lanț ușor a unui anticorp PD-L1 furnizat sau domeniul de legare la antigen al acestuia sunt sau cuprind un HCVR și respectiv LCVR, după cum urmează: SECV ID NR: 77 și 82.

25 În unele exemple de realizare, perechea de lanț greu și lanț ușor a unui anticorp PD-L1 furnizat sunt sau cuprind secvențele de aminoacizi așa cum se arată în SECV ID NR: 86 și 87.

Regiunea variabilă a lanțului greu a unui anticorp PD-L1 furnizat are cele trei CDR-uri având următoarele secvențe: GFSLSNYD (HCDR1, SECV ID NR: 60), IWTGGAT (HCDR2, SECV ID NR: 61), VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3; SECV ID NR: 62).

30 Regiunea variabilă a lanțului ușor a unui anticorp PD-L1 furnizat are cele trei CDR-uri având următoarele secvențe: QSIGTN (LCDR1, SECV ID NR: 63), YAS (LCDR2), QQSNSWPYT (LCDR3; SECV ID NR: 64).

35 Un anticorp PD-L1 furnizat sau un domeniu de legare la antigen al acestuia cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care are cele trei CDR-uri având următoarele secvențe: GFSLSNYD (HCDR1, SECV ID NR: 60), IWTGGAT (HCDR2, SECV ID NR: 61), VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3; SECV ID NR: 62) și o regiune variabilă a lanțului ușor care are cele trei CDR-uri având următoarele secvențe: QSIGTN (LCDR1, SECV ID NR: 63), YAS (LCDR2), QQSNSWPYT (LCDR3; SECV ID NR: 64).

40 Dacă nu se indică altfel, toate secvențele CDR dezvăluite aici sunt definite conform metodei IMGT așa cum este descrisă în Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999). CDR1 constă din pozițiile 27 până la 38, CDR2 constă din pozițiile 56 până la 65, CDR3 pentru genele V ale liniei germinale este format din pozițiile 105 până la 116, CDR3 pentru genele V-J rearanjate sau genele V-D-J constă din pozițiile 105 până la 117 PHE sau J-TRP 118) cu goluri în partea de sus a nucleii pentru CDR3-IMGT rearanjat cu mai puțin de 13 aminoacizi sau cu poziții suplimentare 112.1, 111.1, 112.2, 111.2 etc. pentru CDR3-IMGT rearanjat cu mai mult de 13 aminoacizi. Pozițiile date în acest paragraf sunt conform numerotării IMGT descrise în Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999).

45 Anticorpii care se leagă în mod specific la PD-L1 așa cum sunt incluși în proteinele de fuziune din dezvăluire pot cuprinde o parte Fc care permite extinderea *in vivo* a timpului de înjumătățire al moleculei de legare bispecifică din dezvăluire. În unele exemple de realizare, o astfel de parte Fc este de preferință de origine umană, mai preferabil o parte Fc umană a unui anticorp IgG1 sau IgG4, chiar mai preferabil o parte Fc umană modificată a unui IgG1 sau IgG4 cu funcții efectoare de activare sau amuțire.

50 În unele exemple de realizare, funcțiile efectoare de amuțire pot fi preferate în detrimentul funcțiilor efectoare de activare. În unele exemple de realizare, o astfel de parte Fc este proiectată pentru a amuți funcțiile efectoare cu mutații la pozițiile 234 și/sau 235, numerotare conform indexului UE al Kabat (Johnson și Wu, Nucleic Acids Res, 2000). În unele exemple de realizare, pot fi introduse mutații în pozițiile F234 și L235 ale unui anticorp anti-PD-L1 furnizat pentru a reduce funcțiile efectoare. În alte

55 exemple de realizare, pot fi introduse mutații în pozițiile D265 și P329 ale unui anticorp anti-PD-L1 furnizat pentru a reduce funcția efector. Numerotarea pentru ambele seturi ale acestor potențiale mutații este conform indicelui UE Kabat (Shields și colab., J Biol Chem, 2001).

Diferite tehnici pentru producerea de anticorpi și fragmente ale acestora sunt bine cunoscute în domeniu și descrise, de exemplu, în Altshuler și colab. (2010). Astfel, de exemplu, anticorpii policlonali

pot fi obținuți din sângele unui animal în urma imunizării cu un antigen în amestec cu aditivi și adjuvanți, iar anticorpii monoclonali pot fi produși prin orice tehnică care furnizează anticorpi produși prin culturi de linii celulare continue. Exemple de astfel de tehnici sunt descrise, de exemplu, Harlow și Lane (1999), (1988) și includ tehnica hibridomului descrisă inițial de Köhler și Milstein, 1975, tehnica triomului, tehnica hibridomului cu celule B umane (vezi de ex. Li și colab., Proc Natl Acad Sci USA, 2006, Kozbor și Roder, Immunol Today, 1983) și tehnica EBV-hibridom pentru a produce anticorpi monoclonali umani (Cole și colab., Cancer Res, 1984). Mai mult, anticorpii recombinanți pot fi obținuți din anticorpi monoclonali sau pot fi preparați *de novo* folosind diverse metode de afișare, cum ar fi afișarea fagică, ribozomală, ARNm sau a celulelor.

10 C. Muteine de lipocalină exemplificative din dezvoltare.

Lipocalinele sunt molecule de legare proteinacee care au evoluat în mod natural pentru a lega liganzii. Lipocalinele apar în multe organisme, inclusiv vertebrate, insecte, plante și bacterii. Membrii familiei proteinelor lipocaline (Pervaiz și Brew, FASEB J, 1987) sunt de obicei proteine mici, secretate și au un singur lanț polipeptidic. Ele sunt caracterizate printr-o serie de proprietăți diferite de recunoaștere moleculară: legarea lor de diferite molecule mici, în principal hidrofobe (cum ar fi retinoizi, acizi grași, colesterol, prostaglandine, biliverdine, feromoni, agenți și odoranți) și legarea lor de receptori specifici de suprafață celulară și formarea de către aceștia de complexe macromoleculare. Deși în trecut au fost clasificate în primul rând ca proteine de transport, acum este clar că lipocalinele îndeplinesc o varietate de funcții fiziologice. Acestea includ roluri în transportul retinolului, olfacția, semnalizarea feromonilor și sinteza prostaglandinelor. Lipocalinele au fost, de asemenea, implicate în reglarea răspunsului imun și în medierea homeostaziei celulare (revizuite, de exemplu, în Flower și colab., Biochim Biophys Acta, 2000, Flower, Biochim J, 1996).

Lipocalinele au niveluri neobișnuit de scăzute de conservare generală a secvenței, adesea cu identități de secvență mai mici de 20%. În contrast puternic, modelul lor general de pliere este foarte bine conservat. Partea centrală a structurii lipocalinei constă dintr-o singură foaie β anti-paralelă cu opt catene închise înapoi pe ea însăși pentru a forma un cilindru β legat continuu de hidrogen. Acest cilindru β formează o cavitate centrală. Un capăt al cilindrului este blocat steric de segmentul peptidic N-terminal care trece prin fundul său, precum și de trei bucle de peptide care conectează catenele β . Celălalt capăt al cilindrului β este deschis solventului și cuprinde un situs de legare la țință, care este format din patru bucle peptidice flexibile (AB, CD, EF și GH). Diversitatea buclelor din schelele de lipocalină, altfel rigidă, dă naștere unei varietăți de moduri de legare diferite, fiecare capabil să găzduiască țințe de dimensiuni, forme și caracter chimic diferite (revizuite, de exemplu, în Skerra, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower și colab., Biochim Biophys Acta, 2000, Flower, Biochim J, 1996).

O muteină de lipocalină conform prezentei dezvoltării poate fi o muteină a oricărei lipocaline. Exemple de lipocaline adecvate (denumite uneori și „lipocalină de referință”, „lipocalină de tip sălbatic”, „schele pentru proteine de referință” sau pur și simplu „schele”) dintre care poate fi utilizată o muteină includ, dar nu se limitează la, lipocalină lacrimală (lipocalină-1, Tlc sau proteina glandei von Ebner), proteină de legare a retinolului, prostaglandina D-sintază de tip lipocalină neutrofilă, β -lactoglobulină, proteină de legare a bilinei (BBP), apolipoproteina D (APOD), lipocalină asociată gelatinazei neutrofile (NGAL), proteina legată de $\alpha 2$ -microglobuline (A2m), 24p3/uterocalin (24p3), proteina 1 a glandei von Ebner (VEGP 1), proteina 2 a glandei von Ebner (VEGP 2) și alergenul major Can f 1 (ALL- 1).

Secvența de aminoacizi a unei muteine de lipocalină conform dezvoltării poate avea o identitate de secvență mare în comparație cu lipocalină de referință (sau de tip sălbatic) din care este derivată, de exemplu, hTlc sau hNGAL, în comparație cu identitățile de secvență cu alta lipocalină (vezi și mai sus). În acest context general, secvența de aminoacizi a unei muteine de lipocalină conform dezvoltării este cel puțin substanțial similară cu secvența de aminoacizi a lipocalinei de referință (de tip sălbatic) corespunzătoare, cu condiția că pot exista lacune (așa cum sunt definite aici) într-o aliniere care sunt rezultatul adăugirilor sau eliminărilor de aminoacizi.

De obicei, o muteină de lipocalină conține unul sau mai multe resturi de aminoacizi mutante - în raport cu secvența de aminoacizi a lipocalinei de tip sălbatic sau de referință, de exemplu, hTlc și hNGAL - în cele patru bucle de la capătul deschis care cuprind o legare a ligandului. buzunar și definesc intrarea buzunarului de legare a ligandului (cf. mai sus). După cum s-a explicat mai sus, aceste regiuni sunt esențiale în determinarea specificității de legare a unei muteine de lipocalină pentru țința dorită.

55 D. Muteine de lipocalină exemplificative specifice CD137 ale descrierii.

Așa cum s-a menționat mai sus, o lipocalină este o polipeptidă definită de structura sa supersecundară, și anume regiunea structurală supersecundară a foliei pliate cilindrică cuprinzând opt catene β conectate în perechi prin patru bucle la un capăt pentru a defini astfel un buzunar de legare. Prezenta dezvoltare nu se limitează la muteinele de lipocalină descrise în mod specific aici. În acest sens, dezvoltarea se referă la o muteină de lipocalină având o regiune structurală supersecundară cilindrică cu

folie plisată p, cuprinzând opt fire p conectate perechi prin patru bucle la un capăt pentru a defini astfel un buzunar de legare, în care cel puțin un aminoacid de fiecare dintre cel puțin trei dintre numitele patru bucle a fost mutată și în care respectiva lipocalină este eficientă pentru a lega CD137 cu afinitate detectabilă.

Într-un aspect, prezenta dezvoltare include orice număr de muteine de lipocalină derivate dintr-o lipocalină de referință (de tip sălbatic), de preferință derivată din hTlc matur sau hNGAL matur, care leagă CD137 cu afinitate detectabilă. Într-un aspect înrudit, dezvoltarea include diferite muteine de lipocalină care sunt capabile să activeze căile de semnalizare din aval ale CD137 prin legarea la CD137. În acest sens, CD137 poate fi privit ca o țintă nenaturală a lipocalinei de referință (de tip sălbatic), de preferință hTlc sau hNGAL, unde „țintă non-naturală” se referă la o substanță care nu se leagă de lipocalinele de referință (tip sălbatic) în condiții fiziologice.

În unele aspecte, prezenta dezvoltare furnizează muteine hNGAL care leagă CD137. În această privință, dezvoltarea furnizează una sau mai multe muteine hNGAL care sunt capabile să lege CD137 cu o afinitate măsurată de un K_D de aproximativ 800 nM, 700 nM, 200 nM, 140 nM, 100 nM sau mai mic, de preferință aproximativ 70 nM, 50 nM, 30 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM sau chiar mai mic.

O muteină hNGAL care leagă CD137 cuprinsă în proteina de fuziune a invenției cuprinde următorul set de resturi de aminoacizi mutante în comparație cu secvența polipeptidică liniară a hNGAL matur așa cum este prezentat în SECV ID NR: 2: Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; și Lys 134 → Tyr. în unele exemple de realizare, o muteină hNGAL cuprinsă în proteina de fuziune a invenției cuprinde secvența de aminoacizi așa cum este prezentată în SECV ID NR: 42.

În unele exemple de realizare, o muteină hNGAL cuprinsă în proteina de fuziune a invenției are cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau o identitate de secvență mai mare cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 42.

În unele exemple de realizare, proteina de fuziune a invenției cuprinde o muteină de lipocalină care leagă CD137 cu o afinitate măsurată printr-un K_D de aproximativ 5 nM sau mai mic, în care muteina lipocalină are cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau o identitate de secvență mai mare cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 42.

În unele exemple de realizare, o proteină de fuziune a invenției cuprinde o muteină de lipocalină care poate cuprinde o secvență heterologă de aminoacizi la capătul său N-sau C-terminal, de preferință C-terminal, cum ar fi o etichetă Strep II (SECV ID NR: 12) sau o secvență a situsului de clivaj pentru anumite enzime de restricție, fără a afecta activitatea biologică (legarea la ținta sa, de exemplu, CD137) a muteinei de lipocalină.

În unele exemple de realizare, pot fi introduse modificări suplimentare ale unei muteine de lipocalină pentru a modula anumite caracteristici ale muteinei, cum ar fi pentru a îmbunătăți stabilitatea plierii, stabilitatea serului, rezistența la proteine sau solubilitatea în apă sau pentru a reduce tendința de agregare sau pentru a introduce noi caracteristici la muteină. În unele variante de realizare, modificările pot avea ca rezultat modularea a două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10) caracteristici ale unei muteine furnizate.

De exemplu, este posibilă mutarea uneia sau mai multor poziții de secvență de aminoacizi ale unei muteine de lipocalină pentru a introduce noi grupări reactive, de exemplu, pentru conjugarea cu alți compuși, cum ar fi polietilen glicol (PEG), hidroxietil amidon (HES), biotină, peptide sau proteine, sau pentru formarea de legături disulfură nenaturale. Compusul conjugat, de exemplu, PEG și HES, poate crește în unele cazuri timpul de înjumătățire al serului muteinei de lipocalină corespunzătoare.

În unele exemple de realizare, o grupare reactivă a unei muteine de lipocalină poate apărea în mod natural în secvența sa de aminoacizi, cum ar fi resturile de cisteină care apar în mod natural în secvența de aminoacizi menționată. În alte variante de realizare, o astfel de grupare reactivă poate fi introdusă prin mutageneză. În cazul în care o grupare reactivă este introdusă prin mutageneză, o posibilitate este mutația unui aminoacid în poziția corespunzătoare de către un rest de cisteină. Posibilitățile exemplificative ale unei astfel de mutații de a introduce un rest de cisteină în secvența de aminoacizi a unei muteine hTlc includ substituțiile Thr 40 → Cys, Glu 73 → Cys, Arg 90 → Cys, Asp 95 → Cys și Glu 131 → Cys ale secvenței de tip sălbatic a hTlc (SECV ID NR: 1). Posibilitățile exemplificative ale unei astfel de mutații de a introduce un rest de cisteină în secvența de aminoacizi a unei muteine hNGAL includ introducerea unui rest de cisteină la una sau mai multe dintre pozițiile secvenței care corespund cu pozițiile secvenței 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 sau 158 din secvența de tip sălbatic a hNGAL (SECV ID NR: 2). Porțiunea tiol generată poate fi utilizată pentru a

PEGilarea sau HESilarea muteinei, de exemplu, pentru a crește timpul de înjumătățire al serului unei muteine de lipocalină respective.

În unele exemple de realizare, pentru a furniza catene laterale de aminoacizi adecvate ca noi grupări reactive pentru conjugarea unuia dintre compușii de mai sus la o muteină de lipocalină, aminoacizii artificiali pot fi introduși în secvența de aminoacizi a unei muteine de lipocalină. În general, astfel de aminoacizi artificiali sunt proiectați să fie mai reactivi și astfel să faciliteze conjugarea la compusul dorit. Astfel de aminoacizi artificiali pot fi introduși prin mutageneză, de exemplu, folosind un ARNt artificial cum este para-acetil-fenilalanina.

E. Utilizări exemplificative și aplicații ale proteinelor de fuziune specifice pentru CD137 și PD-L1

Referirile la metodele de tratament prin terapie sau chirurgie sau metode de diagnostic *in vivo* sau utilizări ale compușilor sau compozițiilor pentru metode de tratament prin terapie sau chirurgie sau metode de diagnostic *in vivo* din acest capitol al descrierii trebuie interpretate ca referiri la compuși, compoziții farmaceutice și medicamente din prezenta invenție pentru utilizare în acele metode.

În unele exemple de realizare, proteinele de fuziune din dezvoltare pot produce efect sinergic prin direcționarea duală a CD137 și PD-L1. În unele variante de realizare, proteinele de fuziune din dezvoltare pot produce efect sinergic prin co-stimularea CD137 și blocarea căii PD-1/PD-L1. În unele exemple de realizare, proteinele de fuziune din dezvoltare pot produce efect anti-tumoral localizat prin direcționarea duală a CD137 și PD-L1. Prin urmare, există numeroase aplicații posibile pentru proteinele de fuziune ale dezvoltării în medicină.

În unele exemple de realizare, prezenta dezvoltare cuprinde utilizarea uneia sau mai multor proteine de fuziune descrise aici sau a uneia sau mai multor compoziții cuprinzând astfel de proteine de fuziune pentru legarea simultană a CD137 și PD-L1.

Prezenta dezvoltare implică, de asemenea, utilizarea uneia sau mai multor proteine de fuziune așa cum este descris pentru formarea complexului cu CD137 și/sau PD-L1.

Prin urmare, într-un aspect al dezvoltării, proteinele de fuziune furnizate pot fi utilizate pentru detectarea CD137 și PD-L1. O astfel de utilizare poate include etapele de a pune în contact una sau mai multe respectivele proteine de fuziune, în condiții adecvate, cu o probă suspectată de a conține CD137 și/sau PD-L1, permițând astfel formarea unui complex între proteinele de fuziune și CD137 și/sau PD-L1 și detectarea complexului printr-un semnal adecvat. Semnalul detectabil poate fi cauzat de o etichetă, așa cum s-a explicat mai sus, sau de o schimbare a proprietăților fizice datorită legării, adică formarea complexului în sine. Un exemplu este rezonanța plasmonului de suprafață, a cărei valoare este modificată în timpul legării partenerilor de legare din care unul este imobilizat pe o suprafață cum ar fi o folie de aur.

Proteinele de fuziune conform dezvoltării pot fi, de asemenea, utilizate pentru separarea CD137 și/sau PD-L1. O astfel de utilizare poate include etapele de punere în contact a uneia sau mai multor respectivele proteine de fuziune, în condiții adecvate, cu o probă presupusă a conține CD137 și/sau PD-L1, permițând astfel formarea unui complex între proteinele de fuziune și CD137 și/sau PD-L1 și separarea complexului de probă.

În unele aspecte, prezenta dezvoltare furnizează truse de diagnostic și/sau analitice care conțin una sau mai multe proteine de fuziune conform dezvoltării.

În plus față de utilizarea lor în diagnosticare, în încă un alt aspect, dezvoltarea are în vedere compoziții farmaceutice care cuprind una sau mai multe proteine de fuziune din dezvoltare și un excipient acceptabil farmaceutic.

Mai mult, în unele exemple de realizare, prezenta dezvoltare furnizează proteine de fuziune care leagă simultan CD137 și/sau PD-L1 pentru utilizare, cum ar fi agenți anti-tumoral și/sau anti-infecții, și modulatori imunitari. În unele variante de realizare, proteinele de fuziune ale prezentei invenții sunt avute în vedere a fi utilizate într-o metodă de prevenire, ameliorare sau tratament a bolilor umane, cum ar fi o varietate de tipuri de cancer, inclusiv cancere PD-L1-pozitive. În consecință, sunt de asemenea furnizate metode de prevenire, ameliorare sau tratare a bolilor umane, cum ar fi o varietate de tipuri de cancer, inclusiv cancerul PD-L1 pozitiv, la un subiect care are nevoie de acestea, cuprinzând administrarea subiectului menționat a unei cantități eficiente terapeutic de unul sau mai multe proteinele de fuziune ale dezvoltării.

Exemple de cancere care pot fi tratate folosind proteinele de fuziune din dezvoltare, includ cancer de ficat, cancer osos, cancer pancreatic, cancer de piele, cancer de cap și gât, cancer de sân, cancer pulmonar, melanom malign cutanat sau intraocular, cancer renal, cancer uterin, cancer ovarian, cancer colorectal, cancer de colon, cancer rectal, cancer al regiunii anale, cancer de stomac, cancer testicular, cancer uterin, carcinom al trompelor uterine, carcinom al endometriului, carcinom al colului uterin, carcinom al vaginului, carcinom al vulvei, limfom non-Hodgkin, cancer al esofagului, cancer al intestinului subțire, cancer al sistemului endocrin, cancer al glandei tiroide, cancer al glandei paratiroide, cancer al glandei suprarenale, sarcom al țesuturilor moi, cancer al uretrei, cancer al penisului, tumori

solide ale copilăriei, limfom limfocitar, cancer al vezicii urinare, cancer al rinichiului sau al ureterului, carcinom al pelvisului renal, neoplasm al sistemului nervos central (SNC), limfom primar al SNC, tumoră angiogenă, tumoră spinală, gliom al trunchiului cerebral, adenom hipofizar, sarcom Kaposi, cancer epidermoid, cancer cu celule scuamoase, cancere induse de mediu inclusiv cele induse de azbest, afecțiuni hematologice maligne incluzând, de exemplu, mielom multiplu, limfom cu celule B, limfom Hodgkin/primar limfom mediastinal cu celule B, limfom non-Hodgkin, limfom mieloid acut, leucemie mielogenă cronică, leucemie limfoidă cronică, limfom folicular, limfom difuz cu celule B mari, limfom Burkitt, limfom imunoblastic cu celule mari, limfom B precursor, limfom cu celule mari, leucemie limfoblastică acută, micoză fungoide, limfom anaplastic cu celule mari, limfom cu celule T și limfom limfoblastic T precursor și orice combinație a cancerelor menționate. În unele exemple de realizare, prezenta invenție este de asemenea aplicabilă pentru tratamentul cancerelor metastatice.

În unele exemple de realizare, proteinele de fuziune ale invenției pot viza simultan celulele tumorale în care PD-L1 este exprimat și pot activa limfocitele sistemului imunitar gazdă adiacente unor astfel de celule tumorale. În unele exemple de realizare, proteinele de fuziune ale invenției pot crește activitatea celulelor T anti-tumorale țintite, pot spori imunitatea anti-tumorală și/sau au un efect direct de inhibare asupra creșterii tumorii, producând astfel rezultate anti-tumorale sinergice. În unele exemple de realizare, proteinele de fuziune ale invenției pot activa răspunsurile imune într-un micromediu tumoral. În unele exemple de realizare, proteinele de fuziune ale invenției pot reduce efectele secundare ale limfocitelor efectoare asupra celulelor sănătoase, adică toxicitatea în afara țintei, de exemplu, prin inhibarea locală a activității oncogene și inducerea activării limfocitelor.

În unele exemple de realizare, prezenta dezvoltare cuprinde utilizarea unei proteine de fuziune conform invenției, sau a unei compoziții care cuprinde o proteină de fuziune furnizată, pentru inducerea unui răspuns limfocitar localizat în vecinătatea celulelor tumorale PD-L1-pozitive. În consecință, în unele exemple de realizare, prezenta dezvoltare furnizează metode de inducere a unui răspuns limfocitar localizat în vecinătatea celulelor tumorale PD-L1-pozitive, cuprinzând aplicarea uneia sau mai multor proteine de fuziune ale invenției sau a uneia sau mai multor compoziții cuprinzând astfel de proteine de fuziune. "Localizat" înseamnă că la legarea simultană a celulelor T prin CD137 și angajarea celulelor tumorale PD-L1-pozitive, celulele T produc citokine, în special IL-2 și/sau IFN gamma în vecinătatea celulelor PD-L1-pozitive. Astfel de citokine reflectă activarea celulelor T care pot fi apoi capabile să omoare celulele pozitive PD-L1, fie direct, fie indirect, prin atragerea altor celule ucigașe, cum ar fi celulele T sau celulele NK.

În unele exemple de realizare, prezenta dezvoltare cuprinde utilizarea unei proteine de fuziune conform invenției sau a unei compoziții care cuprinde o astfel de proteină de fuziune, pentru co-stimularea celulelor T și/sau activarea căilor de semnalizare în aval ale CD137. De preferință, o proteină de fuziune furnizată co-stimulează celulele T și/sau activează căile de semnalizare din aval ale CD137 atunci când se angajează celulele tumorale în care este exprimat PD-L1. Prin urmare, prezenta dezvoltare furnizează metode de inducere a proliferării limfocitelor T și/sau de activare a căilor de semnalizare în aval ale CD137, de preferință atunci când se angajează celule tumorale în care PD-L1 este exprimat, cuprinzând aplicarea uneia sau mai multor proteine de fuziune din dezvoltare și/sau a uneia sau mai multor compoziții cuprinzând astfel de proteine de fuziune.

În unele exemple de realizare, prezenta dezvoltare cuprinde utilizarea unei proteine de fuziune conform invenției sau a unei compoziții care cuprinde o astfel de proteină de fuziune, pentru inducerea grupării CD137 și activarea pe celulele T și direcționarea acestor celule T către celulele tumorale în care PD-L1 este exprimat.

F. Producerea de proteine de fuziune furnizate exemplificativ specifice pentru CD137 și PD-L1.

În unele exemple de realizare, prezenta dezvoltare furnizează molecule de acid nucleic (ADN și ARN) care includ secvențe de nucleotide care codifică o proteină de fuziune așa cum este prezentat în setul de revendicări anexat. În unele exemple de realizare, dezvoltarea cuprinde o celulă gazdă care conține o moleculă de acid nucleic furnizată. Deoarece degenerarea codului genetic permite înlocuirea anumitor codoni cu alți codoni care specifică același aminoacid, dezvoltarea nu se limitează la o moleculă specifică de acid nucleic care codifică o proteină de fuziune așa cum este descrisă aici, ci mai degrabă, cuprinzând toate moleculele de acid nucleic care includ secvențe de nucleotide care codifică o proteină de fuziune funcțională. În acest sens, prezenta dezvoltare se referă, de asemenea, la secvențe de nucleotide care codifică proteinele de fuziune furnizate.

O moleculă de acid nucleic, cum ar fi ADN, este denumită „capabilă de a exprima o moleculă de acid nucleic” sau „capabilă să permită exprimarea unei secvențe de nucleotide” dacă include elemente de secvență care conțin informații referitoare la reglarea transcripțională și/sau translațională, și astfel de secvențe sunt „legate operabil” la secvența de nucleotide care codifică proteina. O legătură operabilă este o legătură în care elementele secvenței reglatoare și secvența care urmează să fie exprimată sunt conectate

într-un mod care permite exprimarea genei. Natura precisă a regiunilor de reglare necesare pentru expresia genelor poate varia între specii, dar în general aceste regiuni includ un promotor, care, la procariote, conține atât promotorul în sine, adică elementele ADN care direcționează inițierea transcripției, cât și elemente ADN care, atunci când sunt transcrise în ARN, vor semnaliza inițierea translației. Astfel de regiuni promotore includ în mod normal secvențe necodificatoare 5' implicate în inițierea transcripției și translației, cum ar fi casetele -35/-10 și elementul Shine-Dalgarno la procariote sau cutia TATA, secvențele CAAT și elementele de acoperire 5' la eucariote. Aceste regiuni pot include, de asemenea, elemente amplificatoare sau represoare, precum și secvențe de semnal traduse și lider pentru ținerea proteinei native către un compartiment specific al unei celule gazdă.

În plus, secvențele necodificatoare 3' pot conține elemente de reglare implicate în terminarea transcripției, poliadenilare sau altele asemenea. Dacă, totuși, aceste secvențe de terminare nu sunt funcționale satisfăcător într-o celulă gazdă particulară, atunci ele pot fi substituite cu semnale funcționale în acea celulă.

Prin urmare, o moleculă de acid nucleic din dezvoltare poate fi „legată operabil” la una sau mai multe secvențe reglatoare, cum ar fi o secvență promotor, pentru a permite exprimarea acestei molecule de acid nucleic. În unele exemple de realizare, o moleculă de acid nucleic conform dezvoltării include o secvență de promotor și o secvență de terminare a transcripției. Promotorii procariotici adecvați sunt, de exemplu, promotorul tet, promotorul lacUV5 sau promotorul T7. Exemple de promotori utili pentru exprimare în celulele eucariote sunt promotorul SV40 sau promotorul CMV.

În unele exemple de realizare, moleculele de acid nucleic prevăzute pot face, de asemenea, parte dintr-un vector sau orice alt tip de vehicul de donare, cum ar fi o plasmidă, o fagemidă, un fag, un baculovirus, o cosmidă sau un cromozom artificial.

În unele exemple de realizare, o moleculă de acid nucleic furnizată poate fi inclusă într-un fagemid. Așa cum este utilizat în acest context, un vector fagemid denotă un vector care codifică regiunea intergenică a unui fag temperat, cum ar fi M13 sau f1, sau o parte funcțională a acestuia fuzionată cu ADNc-ul de interes. De exemplu, în unele exemple de realizare, după suprainfecția celulelor gazdă bacteriene cu un astfel de vector fagemid furnizat și un fag auxiliar adecvat (de exemplu, M13K07, VCS-M13 sau R408) sunt produse particule de fag intacte, permițând astfel cuplarea fizică a cADN-ului heterolog codificat. la polipeptida ei corespunzătoare afișată pe suprafața fagului (Lowman, Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1997, Rodi și Makowski, Curr Opin Biotechnol, 1999).

În conformitate cu diferite exemple de realizare, vehiculele de donare pot include, în afară de secvențele de reglare descrise mai sus și o secvență de acid nucleic care codifică o proteină de fuziune așa cum este descrisă aici, secvențe de replicare și control derivate de la o specie compatibilă cu celula gazdă care este utilizată pentru exprimare ca precum și markeri de selecție care conferă un fenotip selectabil celulelor transformate sau transfectate. Un număr mare de vectori de donare adecvați sunt cunoscuți în domeniu și sunt disponibili comercial.

Dezvoltarea se referă, de asemenea, în unele exemple de realizare, la metode pentru producerea proteinelor de fuziune conform dezvoltării pornind de la un acid nucleic care codifică o proteină de fuziune sau orice subunități din aceasta, utilizând metode de inginerie genetică așa cum sunt prezentate în setul de revendicări anexat. În unele exemple de realizare, poate fi efectuată o metodă furnizată *in vivo*, în care o proteină de fuziune furnizată poate fi, de exemplu, produsă într-un organism gazdă bacterian sau eucariot, și apoi izolată din acest organism gazdă sau cultura sa. De asemenea, este posibil să se producă o proteină de fuziune conform dezvoltării *in vitro*, de exemplu, folosind un sistem de traducere *in vitro*.

La producerea unei proteine de fuziune *in vivo*, un acid nucleic care codifică o astfel de proteină de fuziune poate fi introdus într-un organism gazdă bacterian sau eucariot adecvat utilizând tehnologia ADN recombinant bine cunoscută în domeniu. În unele exemple de realizare, o moleculă de ADN care codifică o proteină de fuziune conform invenției, și în special un vector de donare care conține secvența de codificare a unei astfel de proteine de fuziune poate fi transformată într-o celulă gazdă capabilă să exprime gena. Transformarea poate fi realizată folosind tehnici standard. Astfel, dezvoltarea este, de asemenea, direcționată către celule gazdă care conțin o moleculă de acid nucleic așa cum este dezvoltat aici.

În unele exemple de realizare, celulele gazdă transformate pot fi cultivate în condiții adecvate pentru exprimarea secvenței de nucleotide care codifică o proteină de fuziune conform invenției. În unele variante de realizare, celulele gazdă pot fi procariote, cum ar fi *Escherichia coli* (*E. coli*) sau *Bacillus subtilis*, sau eucariote, cum ar fi *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, celule de insecte SF9 sau High5, linii celulare de mamifere imortalizate (de exemplu, celule HeLa sau celule CHO) sau celule primare de mamifere.

În unele exemple de realizare, în care o muteină de lipocalină conform dezvoltării, așa cum este cuprinsă într-o proteină de fuziune, așa cum este prezentată în setul de revendicări anexat, include legături

disulfurice intramoleculare, poate fi de preferat să se direcționeze proteina în curs de dezvoltare către un compartiment celular având un mediu redox oxidant folosind o secvență de semnal adecvată. Un astfel de mediu oxidant poate fi asigurat de periplasma bacteriilor Gram-negative, cum ar fi *E. coli*, în mediul extracelular al bacteriilor Gram-pozitive sau lumenul reticulului endoplasmatic al celulelor eucariote și

5 favorizează de obicei formarea legăturilor disulfurice structurale.

În unele exemple de realizare, este de asemenea posibil să se producă o proteină de fuziune conform invenției în citosolul unei celule gazdă, de preferință *E. coli*. În acest caz, o proteină de fuziune furnizată poate fi fie obținută direct într-o stare solubilă și pliată, fie recuperată sub formă de corpi de

10 incluziune, urmată de renaturare *in vitro*. O altă opțiune este utilizarea unor tulpini gazdă specifice care au un mediu intracelular oxidant, care poate permite astfel formarea de legături disulfurice în citosol (Venturi și colab., J Mol Biol, 2002).

Persoana de specialitate va aprecia metodele utile pentru prepararea proteinelor de fuziune avute în vedere de prezenta dezvoltare, dar ale căror proteine sau secvențe de acid nucleic nu sunt dezvoltate în mod explicit aici. Ca o vedere de ansamblu, astfel de modificări ale secvenței de aminoacizi includ, de

15 V. EXEMPLE

Exemplul 1: Exprimarea și analiza proteinelor de fuziune reprezentative

În acest exemplu, proteinele de fuziune reprezentative anticorp-muteină lipocalină au fost

25 generate prin fuzionarea împreună a unui anticorp specific PD-L1 având lanțul greu furnizat de SECV ID NR: 86 sau cuprind un domeniu variabil al lanțului greu al SECV ID NR: 77 sau cuprinzând CDR-urile GFSLSNYD (HCDR1, SECV ID NR: 60), IWTGGAT (HCDR2, SECV ID NR: 61), VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3; SECV ID NR: 62) și lanțuri ușoare furnizate de SECV ID NR: 87 sau cuprind un domeniu variabil al lanțului greu al SECV ID NR: 82 sau cuprinzând CDR-urile QSIGTN (LCDR1, SECV ID NR: 63), YAS (LCDR2), QQSNSWPYT (LCDR3; SECV ID NR: 64) și muteina de

30 lipocalină specifică CD137 a SECV ID NR: 42, prin intermediul unui linker, cum ar fi un linker nestructurat (G₄S)₃ al SECV ID NR: 13, pentru a angaja PD-L1 și CD137 în același timp. Diferitele formate care au fost generate sunt descrise în **Figura 1**. De exemplu, astfel de proteine de fuziune, de exemplu, SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93,

35 SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91, au fost generate prin fuzionarea uneia sau mai multor muteine de lipocalină din SECV ID NR: 42 la unul sau mai multe dintre cele patru capete ale unui anticorp care cuprinde lanțul greu furnizat de lanțul greu furnizat de SECV ID NR: 86, sau cuprind un domeniu variabil al lanțului greu al SECV ID NR: 77, sau cuprinzând CDR-urile lui GFSLSNYD (HCDR1, SECV ID NR: 60), IWTGGAT (HCDR2, SECV ID NR: 61), VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3;

40 SECV ID NR: 62) și lanțuri ușoare furnizate de SECV ID NR: 87 sau cuprind un domeniu variabil al lanțului greu al SECV ID NR: 82 sau care cuprind CDR-urile QSIGTN (LCDR1, SECV ID NR: 63), YAS (LCDR2), QQSNSWPYT (LCDR3; SECV ID NR: 64). Proteinele de fuziune generate pot fi bivalente cu CD137 (de exemplu, așa cum este descris în **Figura 1A-1D**) sau tetravalent la CD137 (de exemplu, așa cum este descris în **Figura 1E-1H**), sau au o valență și mai mare pentru CD137 (de

45 exemplu, așa cum este descris în **Figura 1I**).

Anticorpii specifici PD-L1, precum și toate proteinele de fuziune cu anticorpi muteină de lipocalină descrise în acest exemplu au avut un schelet IgG4 proiectat, care conținea o mutație S228P pentru a minimiza schimbul de semi-anticorpi IgG4 *in vitro* și *in vivo* (Silva și colab., J Biol Chem, 2015). Mutații suplimentare în schelele IgG4 pot exista, de asemenea, în toți anticorpii și proteinele de

50 fuziune descrise aici, incluzând oricare sau mai multe dintre mutațiile F234A, L235A, M428L, N434S, M252Y, S254T și T256E. Mutațiile F234A și L235A pot fi introduse pentru a scădea ADCC și ADCP (Glaesner și colab., Diabetes Metab Res Rev, 2010). Mutațiile M428L și N434S sau mutațiile M252Y, S254T și T256E pot fi introduse pentru un timp de înjumătățire plasmatică extins (Dall'Acqua și colab., J Biol Chem, 2006, Zalevsky și colab., Nat Biotechnol, 2010). Toți anticorpii au fost exprimați fără lizina carboxi-terminală pentru a evita heterogenitatea.

În plus, fuziunile Fc de muteină de lipocalină monospecifică au fost generate prin fuzionarea uneia sau mai multor muteine de lipocalină specifice CD137 din SECV ID NR: 42, prin intermediul unui linker, de exemplu, un linker nestructurat (G₄S)₃ al SECV ID NR: 13, la Capătul C-terminal al regiunii

Fc a unui anticorp furnizat în SECV ID NR: 30 așa cum este descris în **Figura 1J-1K**. Construcția rezultată este furnizată în SECV ID NR: 88-89.

Construcțiile proteinelor de fuziune au fost generate prin sinteza genelor și donate într-un vector de expresie de mamifer. Ele au fost apoi exprimate tranzitoriu în celule Expi293FTM (Life Technologies). Concentrația proteinelor de fuziune în mediul de cultură celulară a fost măsurată prin HPLC (Agilent Technologies) utilizând o coloană de afinitate POROS® pentru proteina A (Applied Biosystems). Titrurile proteinelor de fuziune au fost rezumate în Tabelul 1.

Proteinele de fuziune au fost purificate utilizând cromatografia cu proteină A urmată de cromatografia de excludere pe bază de mărime (SEC) în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS). După purificarea SEC, fracțiile care conțin proteină monomerică sunt reunite și analizate din nou utilizând SEC analitic.

Tabelul 1: Titruri de expresie tranzitorie

SECV ID NR	Titlul de expresie [mg/mL]
SECV ID NR: 90 și 87	0,05
SECV ID NR: 86 și 91	0,07
SECV ID NR: 92 și 87	0,06
SECV ID NR: 86 și 93	0,09
SECV ID NR: 94 și 87	0,06
SECV ID NR: 90 și 91	0,10
SECV ID NR: 88	0,24
SECV ID NR: 86 și 87	0,07

Exemplul 2: Exprimarea proteinelor de fuziune

Construcțiile de proteine de fuziune exemplificative au fost generate prin sinteza genelor, incluzând optimizarea codonilor și donate într-un vector de expresie de mamifer. Ele au fost apoi exprimate stabil în celulele ovarelor de hamster chinezesc (CHO). Concentrația de proteine de fuziune în mediul de cultură celulară a fost măsurată utilizând Octet (ForteBio, Pall Corp.) cu senzori Protein-A și cuantificată folosind standardul IgG1 uman. Titrurile proteinelor de fuziune au fost rezumate în **Tabelul 2**. Datele sugerează că geometria proteinelor de fuziune poate avea o influență asupra randamentului produsului și a productivității celulare.

Tabelul 2: Titruri stabile de expresie

SECV ID NR	Titlul de expresie [mg/mL]
SECV ID NR: 90 și 87	1,423
SECV ID NR: 86 și 91	1,502
SECV ID NR: 92 și 87	0,456
SECV ID NR: 86 și 93	0,294
SECV ID NR: 94 și 87	0,293
SECV ID NR: 90 și 91	1,297
SECV ID NR: 88	0,150
SECV ID NR: 86 și 87	1,018

Exemplul 3: Legarea proteinelor de fuziune de PD-L1 sau CD137 determinată prin rezonanța plasmonului de suprafață (SPR)

Cinetica de legare și afinitatea proteinelor de fuziune exemplare la huPD-L1-His sau huCD137-His (PD-L1 uman sau CD137 uman cu o etichetă de polihistidină C-terminală, R&D Systems) au fost determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață (SPR) folosind un Biacore 8K sau un Biacore T200 (GE Healthcare).

Anticorpul anti-uman IgG Fc (GE Healthcare) a fost imobilizat pe un cip senzor CM5 folosind chimia standard a aminei: grupările carboxil de pe cip au fost activate folosind 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă (EDC) și N -hidroxisuccinimidă (NHS). Ulterior, soluția de anticorpi anti-uman IgG Fc (GE Healthcare) la o concentrație de 25 μg/mL în 10 mM acetat de sodiu (pH 5,0) a

fost aplicată la un debit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ până ce un nivel de imobilizare de 6000-10000 de unități de rezonanță (RU) a fost atins. Esterii NHS reziduali care nu au reacționat au fost blocați prin trecerea unei soluții de etanolamină 1 M peste suprafață. Canalul de referință a fost tratat într-un mod analog. Ulterior, testarea proteinelor de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87, SECV ID NR: 90 și 91, SECV ID NR: 88 și SECV ID NR: 89) la 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ în tampon HBS-EP+ a fost capturat de anticorpii anti-IgG-Fc uman la suprafața cipului timp de 180 s. la un debit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. După fiecare etapă de capturare, acul a fost spălat. Anticorpi anti-PD-L1, incluzând un anticorp de referință (SECV ID NR: 26 și 27) și un anticorp așa cum este inclus în proteinele de fuziune (SECV ID NR: 86 și 87) și un anticorp de referință anti-CD137 (SECV ID NR: 28 și 29) au fost, de asemenea, testate ca martori.

Pentru determinarea afinității, diluțiile de huPD-L1-His (10 nM, 5 nM și 2,5 nM sau huCD137-His (900 nM, 300 nM și 100 nM) au fost preparate în tampon HBS-EP+ și aplicate pe suprafața cipului preparat. Testul de legare a fost efectuat cu un timp de contact de 180 s, un timp de disociere de 900 s și un debit de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Toate măsurătorile au fost efectuate la 25 °C. Regenerarea suprafeței cipului a fost realizată cu injecții de 3 s. M MgCl_2 timp de 120 s. Înainte de măsurătorile proteinelor, au fost efectuate trei cicluri de pornire în scopuri de condiționare. Datele au fost evaluate cu software-ul de evaluare Biacore T200 (v2.0) sau cu software-ul de evaluare Biacore 8K (V1.1.1). A fost utilizată dublă referință și a fost folosit modelul de legare 1:1 pentru a se potrivi cu datele brute.

Valorile determinate pentru k_{on} , k_{off} , și constanta de disociere de echilibru rezultată (K_D) pentru proteinele de fuziune reprezentative sunt rezumate în **Tabelul 3**. Toate proteinele de fuziune bispecifice (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91) leagă PD-L1 precum și CD137 cu afinitate subnanomolară până la nanomolară scăzută. Fuziunile monospecifice CD137- muteină de lipocalină-Fc (SECV ID NR: 88 și SECV ID NR: 89) leagă CD137 doar cu afinitate nanomolară scăzută.

Tabelul 3: Constante cinetice și afinități ale proteinelor de fuziune determinate de SPR

SECV ID NR	huPD-L1			huCD137		
	k_{on} [$\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]	k_{on} [$\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]
90 și 87	1,30E+06	7,69E-04	0,592	3,93E+04	2,55E-04	6,484
86 și 91	1,32E+06	7,48E-04	0,568	3,42E+04	1,75E-04	5,106
92 și 87	7,87E+05	8,03E-04	1,021	3,48E+04	2,08E-04	5,966
86 și 93	5,46E+05	7,54E-04	1,381	3,68E+04	1,30E-04	3,548
94 și 87	1,51E+06	9,16E-04	0,608	4,07E+04	2,24E-04	5,504
90 și 91	1,60E+06	8,61E-04	0,537	3,91E+04	2,24E-04	5,726
88	N / A.	N / A.	N / A.	3,94E+04	1,63E-04	4,155
86 și 87	1,09E+06	6,49E-04	0,593	N / A.	N / A.	N / A.
89	N / A.	N / A.	N / A.	3,66E+04	1,32E-04	3,595
26 și 27	6,38E+05	2,01E-04	0,314	N / A.	N / A.	N / A.
28 și 29	N / A.	N / A.	N / A.	4,72E+05	2,94E-03	6,237

Exemplul 4. Legarea proteinelor de fuziune de PD-L1 sau CD137 în testul imunosorbent legat de enzime (ELISA)

Un test de imunosorbție legat de enzime (ELISA) a fost folosit pentru a determina potența de legare a proteinelor de fuziune exemplare la PD-L1 uman și cynomolgus PD-L1.

HuPD-L1-His sau cyPD-L1-His recombinant (PD-L1 uman sau cynomolgus cu o etichetă polihistidină C-terminală, R&D Systems sau Sino Biologicals) la o concentrație de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ în PBS a fost acoperit peste noapte pe plăci de microtitrare la 4°C. După spălarea cu PBS-0,05%T (PBS suplimentat cu 0,05% (v/v) Tween 20), plăcile au fost blocate cu 2% BSA (g/v) în PBS-0,1%T (PBS suplimentat cu 0,1% (v/v) Tween 20) timp de 1 oră la temperatura camerei. După spălare cu 100 μL PBS-0,05%T de cinci ori, proteine de fuziune exemplificative (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87, SECV ID NR: 90 și 91), Fc fuzionează o muteină de lipocalină specifică CD137 (SECV ID NR: 88 și SECV ID NR: 89) și anticorpi anti-PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27, SECV ID NR: 86 și 87), la diferite concentrații au fost adăugate în godeuri și incubate timp de 1 oră la temperatura camerei, urmată de o altă etapă de spălare. Moleculele legate în

studii au fost detectate prin incubare cu Fc-HRP IgG anti-umană diluată 1:5000 (Jackson Laboratory) în PBS-0,1%T-2%BSA. După o etapă suplimentară de spălare, substrat HRP fluorogen (QuantaBlu, Thermo) a fost adăugat la fiecare godeu și intensitatea fluorescenței a fost detectată utilizând un cititor de microplăci cu fluorescență.

Aceeași configurație ELISA a fost, de asemenea, utilizată pentru a determina potența de legare a proteinelor de fuziune la CD137, unde huCD137-His (CD137 uman cu etichetă polihistidină C-terminală, R&D Systems) sau cyCD137-Fc (cynomolgus CD137 C-terminal fuzionat cu Fc) în schimb acoperite pe o placă de microtitrare. Agenții de testare au fost titrați în mod similar și agenții legați au fost detectați prin intermediul anti-NGAL-HRP.

Rezultatele experimentelor exemplare sunt prezentate în **Figura 2A-2D**, împreună cu curbele de potrivire rezultate dintr-o potrivire sigmoidală de legare 1:1, unde valoarea EC_{50} și semnalul maxim au fost parametri liberi, iar panta a fost fixată la unitate. Valorile EC_{50} rezultate sunt furnizate în **Tabelul 4**.

Valorile EC_{50} observate față de cele două ținte umane ale proteinelor de fuziune furnizate (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87, SECV ID NR: 90 și 91, SECV ID NR: 88 și SECV ID NR: 89) au fost foarte similare sau comparabile cu anticorpii PD-L1 testați (anticorpurile PD-L1 de referință cu SECV ID NR: 26 și 27 și PD-L1 Anticorpurile L1 cu SECV ID NR: 86 și 87, așa cum este inclus în proteinele de fuziune) și/sau muteina de lipocalină specifică CD137, așa cum este inclusă în proteinele de fuziune (SECV ID NR: 42).

Toate proteinele de fuziune testate prezintă reactivitate încrucișată cu cynomolgus PD-L1, cu valori EC_{50} comparabile cu anticorpurile de referință PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27) sau anticorpurile PD-L1 incluse în proteinele de fuziune (SECV ID NR: 86 și 87). Numai proteinele de fuziune care sunt tetravalente cu CD137 (SECV ID NR: 94 și 87, SECV ID NR: 90 și 91 și SECV ID NR: 88) prezintă reactivitate încrucișată cu cynomolgus CD137 la un nivel comparabil cu CD137 uman, adică leagă cynomolgus CD137 cu valori EC_{50} în același interval ca EC_{50} corespunzătoare pentru CD137 uman.

Tabelul 4. Date ELISA pentru legarea PD-L1 sau CD137

SECV ID NR	EC_{50} [nM] Legare la huPD-L1	EC_{50} [nM] Legare la cyPD-L1	EC_{50} [nM] Legare la huCD137	EC_{50} [nM] Legare la cyCD137
90 și 87	0,15	0,13	0,28	5,9
86 și 91	0,23	0,18	0,57	13
92 și 87	0,16	0,15	0,41	9,8
86 și 93	0,19	0,17	0,35	8,1
94 și 87	0,18	0,15	0,16	0,19
90 și 91	0,20	0,17	0,14	0,21
88	N / A.	N / A.	0,15	0,12
86 și 87	0,12	0,1	N / A.	N / A.
89	N / A.	N / A.	0,29	0,82
26 și 27	0,09	0,09	N / A.	N / A.
42	N / A.	N / A.	0,27	N / A.

Exemplul 5. Legarea simultană a proteinelor de fuziune la PD-L1 și CD137 în ELISA

Pentru a demonstra legarea simultană a proteinelor de fuziune exemplare la PD-L1 și CD137, a fost utilizat un format ELISA cu legare dublă.

HuPD-L1-His recombinant (R&D Systems) în PBS (1 μ g/mL) a fost acoperit peste noapte pe plăci de microtitrare la 4°C. Plăcile au fost spălate de cinci ori după fiecare etapă de incubare cu 100 μ L PBS-0,05%T. Plăcile au fost blocate cu 2% BSA (g/v) în PBS-0,1%T timp de 1 oră la temperatura camerei și ulterior spălate din nou. Diferite concentrații de proteine de fuziune testate au fost adăugate în godeuri și incubate timp de 1 oră la temperatura camerei, urmată de o etapă de spălare. Ulterior, huCD137-His biotinitat (huCD137-His-Bio, Sino Biological) a fost adăugat la o concentrație constantă de 1 μ g/mL în PBS-0,1%T-2%BSA timp de 1 oră. După spălare, la godeuri s-a adăugat o diluție 1:5000 de ExtrAvidin-HRP (Sigma-Aldrich) în PBS-0,1%T-2%BSA și s-a incubat timp de 1 oră. După o etapă suplimentară de spălare, substrat HRP fluorogen (QuantaBlu, Thermo) a fost adăugat la fiecare godeu, iar intensitatea fluorescenței a fost detectată folosind un cititor de microplăci cu fluorescență.

Legarea duală a proteinelor de fuziune exemplificative a fost, de asemenea, testată cu o configurație inversă în care 1 µg/ml huCD137-His recombinant (R&D Systems) a fost acoperit pe plăci de microtitrare, iar proteinele de fuziune legate au fost detectate prin adăugarea de huPD-L1-His biotinitat. (Sisteme R&D).

Date de legare dublă a proteinelor de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91) sunt afișate în **Figura 3A și 3B**, împreună cu curbele de potrivire rezultate dintr-o potrivire de legare sigmoidală 1:1, unde valoarea EC₅₀ și semnalul maxim au fost parametri liberi, iar panta a fost fixată la unitate. Valorile EC₅₀ sunt rezumate în **Tabelul 5**. Toate proteinele de fuziune bispecifice prezintă semnale clare de legare, demonstrând că proteinele de fuziune sunt capabile să angajeze PD-L1 și CD137 simultan. Datele au sugerat în plus fuzionarea muteinelor de lipocaline specifice CD137 cu C-terminali ai anticorpilor specifici PD-L1 poate fi mai avantajoasă decât pentru N-terminali.

Tabelul 5. Date ELISA pentru legarea simultană a țintei atât a PD-L1, cât și a CD37

SECV ID NR	EC ₅₀ [nM] PD-L1 captură_CD137 detecție	EC ₅₀ [nM] CD137 captură_PD-L1 detecție
90 și 87	0,58	2,9
86 și 91	0,59	3,3
92 și 87	1,2	7,2
86 și 93	0,74	6,7
94 și 87	0,48	2,6
90 și 91	0,49	2,3

Exemplul 6. Analiza citometrică în flux a proteinelor de fuziune care se leagă de celulele care exprimă CD137 și PD-L1 uman și cynomolgus

Legarea specifică țintă a proteinelor de fuziune la celulele care exprimă PD-L1 umane și cynomolgus și la celulele care exprimă CD137 umane și cynomolgus a fost evaluată prin citometrie în flux.

Celulele CHO au fost transfectate stabil cu PD-L1 uman, PD-L1cynomolgus, CD137 uman, CD137 cynomolgus sau un control simulat utilizând sistemul Flp-In (tehnologii Life) conform instrucțiunilor producătorului.

Celulele CHO transfectate au fost menținute în mediu Ham's F12 (tehnologii Life) suplimentat cu 10% ser fetal de vițel (Biocrom) și 500 µg/ml higromicină B (Roth). Celulele au fost cultivate în baloane de cultură celulară conform instrucțiunilor producătorului (37°C, atmosferă 5% CO₂).

Pentru analiza citometrică în flux, liniile celulare respective au fost incubate cu proteine de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87, SECV ID NR: 90 și 91, SECV ID NR: 88 și SECV ID NR: 89) și detectate utilizând un anticorp anti-IgG uman marcat fluorescent în analiza FACS așa cum este descris în cele ce urmează:

5 × 10⁴ celule per godeu au fost incubate timp de 1 oră în PBS rece cu gheață care conține 5% ser fetal de vițel (PBS-FCS). O serie de diluții ale proteinelor de fuziune și ale anticorpilor de control au fost adăugate la celule și incubate timp de 1 oră pe gheață. Celulele au fost spălate de două ori cu PBS și apoi incubate cu un anticorp de capră anti-hlgG marcat Alexa647 timp de 30 de minute pe gheață. Celulele au fost ulterior spălate și analizate utilizând citometrul iQue Flow (Intellicyte Screener). Semnalele fluorescente geometrice medii au fost reprezentate grafic și potrivite cu software-ul Graphpad utilizând regresia neliniară (partea de jos, SLOPE = 1).

Capacitatea proteinelor de fuziune de a lega PD-L1 și CD137 uman și cynomolgus este descrisă în **Figura 4**. Afinități de legare (EC₅₀) a proteinelor de fuziune bispecifice (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91) celulele care exprimă PD-L1 umane și cynomolgus sunt în intervalul nanomolar cu o singură cifră, demonstrând reactivitate cino-încrucișată completă (rezumată în **Tabelul 6**). Afinitățile de legare ale proteinelor de fuziune la celulele umane care exprimă CD137 sunt în intervalul nanomolar scăzut. Proteinele de fuziune testate sunt complet reactive încrucișat la CD137 cynomolgus (SECV ID NR: 94 și 87, SECV ID NR: 90 și 91 și SECV ID NR: 88), leagă CD137 cynomolgus cu afinități scăzute de 6-13 ori în comparație cu afinități de legare corespunzătoare la CD137 uman (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91 și SECV ID NR: 89), sau nu leagă CD137 cynomolgus (SECV ID NR: 92 și 87 și 86 și 93). Niciuna dintre proteinele de fuziune nu se leagă de celulele transfectate simulate.

Tabelul 6. Afinitățile de legare ale proteinelor de fuziune la celulele care exprimă PD-L1 sau CD137 uman și cynomolgus

SECV NR	ID	EC ₅₀ [nM] Flp-In-CHO::huCD137	EC ₅₀ [nM] Flp-In-CHO::cynoCD137	EC ₅₀ [nM] Flp-In-CHO::huPDL-1	EC ₅₀ [nM] Flp-In-CHO::cynoPDL-1
90 și 87		3,74	51,35	3,64	4,48
86 și 91		6,48	39,15	1,43	1,41
92 și 87		11,91	--	2,95	2,03
86 și 93		12,73	--	4,63	2,03
94 și 87		4,15	6,92	6,99	5,89
90 și 91		4,69	3,66	4,09	3,37
86 și 87		--	--	2,96	3,55
89		5,74	26,70	--	--
88		4,33	3,81	--	--
28 și 29		1,31	--	--	--

Exemplul 7. Afinitățile de legare ale proteinelor de fuziune la celulele tumorale PD-L1-pozitive

Legarea proteinelor de fuziune la celulele tumorale care exprimă PD-L1 a fost evaluată prin citometrie în flux.

PD-L1 care exprimă linia celulară de cancer colorectal RKO a fost menținută în RPMI1640 (Tehnologii Life) suplimentată cu 10% FCS la 37°C într-o atmosferă umidificată de CO₂ 5%.

Pentru analiza citometrică în flux, celulele RKO au fost incubate cu proteine de fuziune și detectate folosind un anticorp anti-IgG uman marcat fluorescent, așa cum este descris în **Exemplul 6**.

Capacitatea proteinelor de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91) de a lega celulele tumorale PD-L1-pozitive este descrisă în **Figura 5** și afinitățile de legare corespunzătoare (EC₅₀) sunt rezumate în **Tabelul 7**. Afinitățile de legare ale proteinelor de fuziune la celulele RKO care exprimă PD-L1 au fost în intervalul nanomolar sau subnanomolar scăzut, comparabil cu anticorpul PD-L1 inclus în proteinele de fuziune (SECV ID NR: 86 și 87).

Tabelul 7. Afinitățile de legare ale proteinelor de fuziune la celulele tumorale PD-L1-pozitive

SECV ID NR	EC ₅₀ [nM] RKO
90 și 87	0,51
86 și 91	0,45
92 și 87	1,00
86 și 93	1,38
94 și 87	0,69
90 și 91	0,53
86 și 87	0,32

Exemplul 8. Determinarea competiției dintre CD137L și proteinele de fuziune în legarea la CD137 prin SPR

Un test SPR a fost utilizat pentru a investiga competiția dintre CD137L uman (huCD137L-His, R&D Systems) și proteinele de fuziune exemplare cu CD137 uman. Testul de competiție a fost efectuat la 25°C pe un instrument Biacore T200 (GE Healthcare).

Reactivul BiotinCAPture (GE Healthcare) a fost imobilizat pe un senzor cu cip CAP la o concentrație de 50 μg/ml și un debit de 2 μl/min timp de 300 s. Canalul de referință a fost tratat într-un mod analog. HuCD137-Fc biotinitat (sisteme R&D) a fost capturat pe suprafața cipului timp de 300 s la o concentrație de 1 μg/mL și la un debit de 5 μl/min pe un alt canal.

Pentru a analiza dacă testele proteinelor de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 90 și 91, SECV ID NR: 90 și 91 NR: 88 și SECV ID NR: 89) concurează cu CD137L pentru a lega CD137, fie tampon de rulare (tampon HBS-EP+), fie 500 nM huCD137L-His a fost aplicat pe suprafața cipului timp de 180 s cu un debit de 30 μL/

min. Ulterior, proteinele de fuziune de testare au fost aplicate pe suprafața cipului preparat în tampon HBS-EP+ la o concentrație fixă de 1 μ M. Testul de legare a fost efectuat cu un timp de contact de 180 s, un timp de disociere de 15 s și un debit de 30 μ L/min. Ca control, injecțiile tampon au fost incluse cu aceiași parametri. Regenerarea suprafeței cipului a fost realizată cu injecții de 6M Gua-HCl, 0,25M NaOH timp de 120 s la un debit de 10 μ L/min, urmată de o etapă suplimentară de spălare cu H₂O (120 s, 10 μ L/min).

Exemple reprezentative pentru segmentul relevant al senzogramelor rezultate sunt furnizate în **Figura 6** pentru proteinele de fuziune ale SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 90 și 91, SECV ID NR: 88 , și SECV ID NR: 89. Urma SPR pentru legarea respectivei proteine de fuziune la huCD137-Fc singur este marcată cu o săgeată cu o tulpină solidă. Urma SPR pentru legarea proteinei de fuziune la huCD137-Fc care a fost saturat cu huCD137L-His este marcată cu o săgeată cu o tulpină ruptă. Datele arată că toate proteinele de fuziune se leagă la huCD137 în prezența huCD137L, dar cu semnale ușor reduse în comparație cu legarea lor la CD137 în absența CD137L. Acest lucru sugerează că proteinele de fuziune testate pot fi împiedicate steric de legarea CD137L la CD137 într-o oarecare măsură. Acest comportament de legare a proteinelor de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 90 și 91, SECV ID NR: 90 și 91 NR: 88 și SECV ID NR: 89) este similară cu cea a anticorpului anti-CD137 SECV ID NR: 28 și 29.

Exemplul 9. Competiția proteinelor de fuziune cu PD-L1 în legarea la PD-1 determinată folosind ELISA

Pentru a demonstra capacitatea proteinelor de fuziune de a inhiba interacțiunea dintre PD-1 și PD-L1, a fost utilizat un format ELISA competitiv.

HuPD-1-His recombinant (Acrobiosystems) în PBS (1 μ g/mL) a fost acoperit peste noapte pe plăci de microtitrare la 4°C. Plăcile au fost spălate de cinci ori după fiecare etapă de incubare cu 100 μ L PBS-0,05%T (PBS suplimentat cu 0,05% (v/v) Tween 20). Plăcile au fost blocate cu 2% BSA (g/v) în PBS-0,1%T (PBS suplimentat cu 0,1% (v/v) Tween 20) timp de 1 oră la temperatura camerei și ulterior spălate din nou. Proteinele de fuziune la diferite concentrații au fost amestecate cu 15 nM de huPD-L1-Fc recombinant (sisteme de cercetare și dezvoltare) ca trasor și incubate timp de 1 oră la temperatura camerei. Amestecuri de proteine de fuziune și trasorul au fost adăugate pe plăci și incubate timp de 20 min la temperatura camerei, urmate de cinci etape de spălare cu 100 μ L PBS-0,05%T. Ulterior, o diluție 1:5000 de IgG-Fc HRP anti-umană de capră (Jackson) a fost adăugată în godeuri și incubată timp de 1 oră. După o etapă suplimentară de spălare, substrat HRP fluorogen (QuantaBlu, Thermo) a fost adăugat la fiecare godeu, iar intensitatea fluorescenței a fost detectată folosind un cititor de microplăci cu fluorescență.

Sunt prezentate date de concurență ale proteinelor de fuziune exemplificative (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93 și SECV ID NR: 90 și 91). În **Figura 7**, împreună cu curbele de potrivire rezultate dintr-o potrivire de legare sigmoidală 1:1, unde valoarea IC₅₀ și semnalul maxim au fost parametri liberi, iar panta a fost fixată la unitate. Valorile IC₅₀ sunt rezumate în **Tabelul 9**. Toate proteinele de fuziune bispecifice au arătat o inhibare clară a interacțiunii PD-1/PD-L1 cu valori IC₅₀ comparabile cu blocul de construcție a anticorpului (SECV ID NR: 86 și 87) și un anticorp de referință PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27).

Tabelul 8. Competiția proteinelor de fuziune cu PD-L1 pentru legarea la PD-1

SECV ID NR	IC ₅₀ [nM]
90 și 87	2,3
86 și 91	3,0
92 și 87	3,4
86 și 93	3,2
94 și 87	2,4
90 și 91	2,8
86 și 87	3,5
26 și 27	3,8

Exemplul 10. Co-stimularea celulelor T dependente de PD-L1 utilizând un biotest CD137

Potențialul proteinelor de fuziune selectate de a induce activarea căii de semnalizare CD137 în prezența PD-L1 a fost evaluat utilizând o linie de celule Jurkat transfectate dublu stabil disponibilă

comercial care exprimă CD137 și gena *luc2* (versiunea umanizată a luciferazei de licurici) întrucât expresia *luc2* este condusă de un element sensibil la NFκB. În acest biotest, angajarea CD137 are ca rezultat semnalizarea intracelulară CD137, ceea ce duce la luminiscenta mediată de NFκB.

PD-L1 care exprimă linia celulară de cancer colorectal RKO a fost cultivată așa cum este descris în **Exemplul 7**. Cu o zi înainte de analiză, celulele RKO au fost placate la $1,25 \times 10^4$ celule per godeu și lăsate să adere peste noapte la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5%.

A doua zi, $3,75 \times 10^4$ celule NF-κB-Luc2/CD137 Jurkat au fost adăugate la fiecare godeu, urmat de adăugarea diferitelor concentrații, de obicei variind de la 0,001 nM la 5 nM, de proteine de fuziune sau un anticorp CD137 de referință (SECV ID NR: 28 și 29). Plăcile au fost acoperite cu un sigiliu permeabil la gaz și incubate la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5%. După 4 ore, 30 μL reactiv Bio-Glo™ a fost adăugat în fiecare godeu și semnalul bioluminescent a fost cuantificat folosind un luminometru (PHERAstar). Analiza curbei logistice cu patru parametri a fost efectuată cu GraphPad Prism® pentru a calcula valorile EC₅₀ (fond comun, panta fixă) care sunt rezumate în **Tabelul 9**. Pentru a demonstra dependența de PD-L1 a angajării CD137 de către proteinele de fuziune, același experiment a fost efectuat în paralel în absența celulelor RKO. Testul a fost efectuat în triplicat.

Rezultatele unui experiment reprezentativ sunt prezentate în **Figura 8A-8D**. Datele demonstrează că toate proteinele de fuziune testate (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87 și SECV ID NR: 86 și 93) au indus o co-stimulare puternică a celulei T mediată de CD137. **Figura 8B și 8D** arată că activarea CD137 de către proteinele de fuziune este dependentă de PD-L1, deoarece nu a fost detectată nicio activare a celulelor Jurkat NF-κB-Luc2/CD137 în absența celulelor tumorale care exprimă PD-L1. În contrast, mAb anti-CD137 de referință (SECV ID NR: 28 și 29) a arătat co-stimulare de celule T mediată de CD137, indiferent de prezența sau absența celulelor țintă.

Tabelul 9. Evaluarea activării celulelor T utilizând un biotest CD137

SECV ID NR	EC ₅₀ [nM] Cu celule RKO
90 și 87	0,0809
86 și 91	0,0889
92 și 87	0,1811
86 și 93	0,2636
28 și 29	0,8135

Exemplul 11. Evaluarea activării celulelor T utilizând celule mononucleare din sângele periferic uman (PBMC)

Un test de celule T a fost folosit pentru a evalua capacitatea proteinelor de fuziune selectate de a co-stimula răspunsurile celulelor T, precum și pentru a preveni co-inhibarea mediată de legarea PD-L1 la PD-1. În acest scop, proteine de fuziune la diferite concentrații au fost adăugate la celulele mononucleare din sângele periferic uman (PBMC) stimulate cu enterotoxina B stafilococică (SEB) și incubate timp de 4 zile la 37°C. Nivelurile de secreție de IL-2 au fost măsurate în supernatanți.

PBMC de la donatori voluntari sănătoși au fost izolate din straturile Buffy prin centrifugare printr-un gradient de densitate a polizaharozei (Biocoll, 1,077 g/mL, Biochrom), urmând protocoalele Biochrom. PBMC-urile purificate au fost resuspendate într-un tampon constând din 90% FCS și 10% DMSO, imediat congelate și depozitate în azot lichid până la utilizare ulterioară. Pentru test, PBMC-urile au fost dezghețate și păstrate în medii de cultură (RPMI 1640, Life Technologies) suplimentate cu 10% FCS și 1% penicilină-streptomycină (Life Technologies) timp de 16 ore la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5%.

Următoarea procedură a fost efectuată folosind triplicate pentru fiecare condiție experimentală: $2,5 \times 10^4$ PBMC-uri au fost incubate în fiecare godeu al unei plăci de cultură de țesut cu fund plat cu 384 de godeuri în medii de cultură. O serie de diluții de proteine de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91), anticorpul PD-L1 bloc (SECV ID NR: 86 și 87), anticorp de referință PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27), anticorp de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29), un cocktail de anticorpi de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29) și un anticorp PD-L1 (SECV ID NR: 86 și 87 sau SECV ID NR: 26 și 27) sau un control izotip (SECV ID NR: 26 și 27) : 24 și 25), în mod tipic variind de la 10 la 0,002 nM și SEB la 0,1 ng/ml au fost adăugate în godeurile respective. Plăcile au fost acoperite cu un sigiliu permeabil la gaz (4titude) și incubate la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5% timp de patru zile. Ulterior, nivelurile de IL-2 din supernatant au fost evaluate utilizând kitul uman IL-2 DuoSet (R&D Systems) așa cum este descris în următoarele proceduri.

384 plăci de godeuri au fost acoperite timp de 2 ore la temperatura camerei cu 1 µg/mL "Human IL-2 Capture Antibody" în PBS. Ulterior, godeurile au fost spălate de 5 ori cu 80 µl PBS suplimentat cu 0,05 % Tween (PBS-T). După 1 oră de blocare în PBS-0,05%T care conține 1% cazeină (g/g), supernatanții de analiză și o serie de concentrații de standard IL-2 diluat în mediu de cultură au fost transferați în godeurile respective și incubate peste noapte la 4°C. A doua zi, s-a adăugat un amestec de 100 ng/mL anticorp de detecție anti-hIL-2-Bio de capră (R&D Systems) și 1 µg/mL streptavidină marcată cu Sulfotag (Mesoscale Discovery) în PBS-T care conține 0,5% cazeină și s-a incubat la temperatura camerei timp de 1 oră. După spălare, s-au adăugat 25 µL tampon de citire (Mesoscale Discovery) în fiecare godeu și semnalul rezultat de electrochimiluminiscență (ECL) a fost detectat de un cititor Mesoscale Discovery. Analiza și cuantificarea au fost efectuate folosind software-ul Mesoscale Discovery.

Rezultatul unui experiment reprezentativ este descris în **Figura 9**. Proteine de fuziune bispecifice ale SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91 sunt capabile de a induce activarea celulelor T, ceea ce este demonstrat prin niveluri crescute de secreție de IL-2 în comparație cu controlul izotipului (hlgG4, Sigma). Cea mai puternică creștere a secreției de IL-2 este observată de proteinele de fuziune tetravalente cu CD137 (SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91), urmate de proteina de fuziune bivalentă cu CD137 cu muteina de lipocalină fuzionată la C-terminalul anticorpului specific PD-L1 (SECV ID NR: 90 și 87 și SECV ID NR: 86 și 91). Cea mai mică creștere se observă cu proteinele de fuziune bivalente cu CD137 cu muteina de lipocalină fuzionată la capătul N-terminal al anticorpului specific PD-L1 (SECV ID NR: 92 și 87 și SECV ID NR: 86 și 93), totuși, încă comparabil cu cocktailul unui anticorp CD137 de referință (SECV ID NR: 28 și 29) și un anticorp de referință PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27). Toate proteinele de fuziune prezintă niveluri de secreție IL-2 mai mari decât blocurile de construcție unice, adică, muteină-Fc de lipocalină specifică CD137 (SECV ID NR: 88 sau SECV ID NR: 89) sau mAb PD-L1 bloc de construcție (SECV ID NR: 86 și 87).

Exemplul 12. Evaluarea activării celulelor T în prezența celulelor tumorale care exprimă nivel diferit de PD-L1

Un alt test de celule T a fost folosit pentru a evalua capacitatea proteinelor de fuziune de a co-stimula activarea celulelor T într-o manieră dependentă de ținta PD-L1. Proteinele de fuziune au fost aplicate la diferite concentrații celulelor T stimulate anti-CD3, în prezența liniilor de celule tumorale cu niveluri diferite de expresie PD-L1. Liniile de celule tumorale testate includ RKO (PD-L1 ridicat), HCC827 (PD-L1 moderat) și Hep-G2 (PD-L1 negativ). Nivelurile de secreție de IL-2 au fost măsurate în supernatanți.

PBMC de la donatori voluntari sănătoși au fost izolați din straturile Buffy așa cum este descris în **Exemplul 11**. Limfocitele T au fost purificate în continuare din PBMC prin sortarea celulelor magnetice folosind un kit de purificare a celulelor Pan T (Miltenyi Biotec GmbH) urmând instrucțiunile producătorului. Celulele Pan T purificate au fost resuspendate într-un tampon constând din 90% FCS și 10% DMSO, imediat congelate și depozitate în azot lichid până la utilizare ulterioară.

Pentru test, celulele T au fost dezghețate și păstrate în medii de cultură (RPMI 1640, Life Technologies) suplimentate cu 10% FCS și 1% penicilină-streptomicină (Life Technologies) timp de 16 ore la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5%.

Următoarea procedură a fost efectuată folosind triplicate pentru fiecare condiție experimentală: plăcile de cultură de țesut cu fund plat au fost pre-acoperite cu 0,25 µg/mL anticorp anti-CD3 timp de 1 oră la 37°C și apoi spălate de două ori cu PBS. Linia celulară tumorală RKO, HCC827 sau Hep-G2 au fost tratate timp de 30 min cu 30 µg/ml mitomicină C (Sigma Aldrich) pentru a bloca proliferarea. Celulele tumorale tratate cu mitomicină au fost apoi spălate de două ori cu PBS și placate la $2,5 \times 10^4$ celule per godeu în mediu de cultură pentru a permite aderența peste noapte la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5%. Celulele țintă fuseseră înainte crescute în condiții standard, detașate folosind Accutase (PAA Laboratories) și resuspendate în mediul de cultură.

În următoarele zile, după spălarea plăcilor de două ori cu PBS, $1,25 \times 10^4$ celule T per godeu au fost adăugate la celulele tumorale. O serie de diluții de proteine de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87 și SECV ID NR: 86 și 93), anticorp de referință PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27) și anticorpul de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29) utilizat singur sau în combinație, sau un control izotip (SECV ID NR: 24 și 25), de obicei variind de la 0,005 nM la 10 nM, au fost adăugate la godeurile corespunzătoare. Plăcile au fost acoperite cu un sigiliu permeabil la gaz și incubate la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5% timp de 3 zile.

După 3 zile de co-cultură, nivelul IL-2 din supernatant a fost evaluat așa cum este descris în **Exemplul 11**.

Date exemplificative sunt prezentate în **Figura 10**. Co-cultivarea celulelor Pan T cu celule RKO (PD-L1 ridicat) sau HCC827 (PD-L1 moderat) în prezența proteinelor de fuziune cu muteina de lipocalină fuzionată la capătul C-terminal al anticorpului specific PD-L1 (SECV ID NR: 90 și 87 și SECV ID NR: 86 și 91) conduc la o creștere clară a secreției IL-2 în comparație cu controlul izotipului hlgG4.

5 Creșterea secreției de IL-2 indusă de proteinele de fuziune cu muteina de lipocalină fuzionată la capătul N-terminal al anticorpului specific PD-L1 (SECV ID NR: 92 și 87 și SECV ID NR: 86 și 93) a fost mai slabă, dar totuși mai mare decât un cocktail de anticorp CD137 de referință (SECV ID NR: 28 și 29) și un anticorp de referință PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27). Nu a fost observată o creștere a secreției de IL-2 cu un cocktail de blocuri de construcție, muteină de lipocalină specifică CD137 (fuziune Fc, SECV ID NR: 89) și anticorp PD-L1 (SECV ID NR: 86 și 87). În plus, co-cultivarea cu Hep-G2 (PD-L1 negativ) nu a crescut nivelurile de secreție de IL-2 cu nicio proteină de fuziune, ci cu cocktailul unui anticorp CD137 de referință (SECV ID NR: 28 și 29) și un PD de referință-anticorp L1 (SECV ID NR: 26 și 27).

Datele indică faptul că activitatea funcțională a proteinelor de fuziune, măsurată prin capacitatea lor de a activa celulele T sau de a crește secreția de IL-2, este dependentă de PD-L1. În contrast, activarea celulelor T sau secreția IL-2 indusă de anticorpul de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29), atunci când este utilizată în combinație cu anticorpul de referință PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27), nu este neapărat dependent de PD-L1 și greu de prezis. Mai mult, datele arată că formatul bispecific de țintire a PD-L1 și CD137 este superior unui cocktail de două molecule separate care vizează CD137 și PD-L1 în prezența celulelor țintă care exprimă PD-L1.

20 **Exemplul 13. Evaluarea stabilității la depozitare a proteinelor de fuziune**

Pentru a evalua stabilitatea depozitării, proteine de fuziune exemplificative (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87, SECV ID NR: 88 și SECV ID NR: 89) au fost incubate timp de 1 săptămână la 37°C la o concentrație de 1 mg/ml în PBS. Proteinele de fuziune monomerice au fost ulterior determinate utilizând excluderea mărimii analitice prin aplicarea a 20 μg de probă pe o coloană Superdex 200, 3,2/300 creștere (GE Healthcare) la un debit de 0,15 ml/min și PBS ca tampon de rulare. Toate peptidele de fuziune testate au fost stabile după incubare de 1 săptămână în PBS la 37 °C. Rezultate exemplare sunt prezentate în **Figura 11A**.

Au fost efectuate evaluări suplimentare ale stabilității la depozitare pentru o proteină de fuziune selectată din SECV ID NR: 90 și 87. Proteina de fuziune la 20 mg/ml a fost incubată timp de patru săptămâni la 40°C în histidină 25 mM, NaCl 60 mM, arginină 200 mM pH 6. Conținutul de proteine funcționale de fuziune a fost măsurat într-o setare ELISA cantitativă, utilizând testul de legare simultană așa cum este descris **Exemplul 5**. Rezultatele exemplare sunt prezentate în **Figura 11B**.

35 **Exemplul 14. Evaluarea reacției limfocitelor mixte (MLR) cu celulele T CD4⁺**

Un test de reacție limfocitară mixtă (MLR) a fost utilizat pentru a evalua capacitatea unei proteine de fuziune exemplară de a induce activarea celulelor T CD4⁺ în prezența celulelor prezentatoare de antigen. Proteina de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87) la diferite concentrații a fost testată în prezența celulelor dendritice derivate de monocite (moDC) și celulelor T CD4⁺ de la donatori sănătoși nepotriviți. După 6 zile de cultivare în prezența moleculelor testate, secreția de IL-2 și IFN-gamma au fost

40 cuantificate în supernatanți.

PBMC-urile au fost purificate din pachetul de sânge pentru afereză trombocitară folosind o soluție Lymphoprep urmând instrucțiunile producătorului (StemCell). Limfocitele T CD4⁺ totale au fost purificate din PBMC folosind un kit Miltenyi și congelate într-o soluție de 90% FBS 10% DMSO. Monocitele CD14⁺ au fost purificate folosind kit de margele CD14⁺ (Miltenyi) și folosit proaspăt.

45 MoDC-urile au fost obținute prin cultivarea monocitelor CD14⁺ în RPMI1640 plus 10% FBS și Pen/Strep (LifeTech) în prezența a 50 ng/mL de IL-4 și 100 ng/mL de GMCSF (Miltenyi) timp de 6 zile la 2×10⁶ celule/ml. În ziua 3, s-au adăugat 10 ml de mediu proaspăt care conține citokine. Fenotipul (CD14, CD1a, HLADR, PD-L1) a fost evaluat în ziua 7 de diferențiere prin FACS.

10000 moDC-uri au fost cultivate în prezența a 50000 celule T CD4⁺ în 96 godeuri cu fundul în formă de U în mediu RPMI complet, în prezența moleculelor testate timp de 6 zile în RPMI în godeuri triple. La sfârșitul culturii, supernatanții au fost imediat congelați și depozitați pentru cuantificarea citokinelor.

50 Nivelul IL-2 a fost măsurat în supernatanți utilizând tehnologia Luminex și sunt prezentate date exemplificative în **Figura 12**. **Figura 12A** arată că proteina de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87) a fost semnificativ mai bună în inducția IL-2 la 10 și 0,1 μg/mL în comparație cu blocurile de construcție corespunzătoare (SECV ID NR: 89 și SECV ID NR: 86 și 87) singure sau un anticorp de referință CD137 sau PD-L1 (SECV ID NR: 28 și 29 sau SECV ID NR: 26 și 27) în mai multe seturi de experimente MLR (N=8). **Figura 12B** indică faptul că proteina de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87) a indus o secreție dependentă de doză de IL-2 în comparație cu un anticorp de control izotip. Nivelurile de IL-2 induse de

proteina de fuziune SECV ID NR: 90 și 87 au fost mai mari în comparație cu concentrațiile echimolare ale cocktail-ului unui anticorp de referință PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27) și a unui anticorp de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29), peste concentrații cuprinse între 0,001 și 20 $\mu\text{g/mL}$.

Exemplul 15. Evaluarea reacției limfocitelor mixte cu celulele T CD8⁺

S-au dat rapoarte privind expresia și activitatea CD137 în celulele T CD8⁺ umane, capacitatea unei proteine de fuziune exemplare de a induce activarea celulelor T CD8⁺ în prezența celulelor care prezintă antigen a fost evaluată într-un test MLR. Proteina de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87) a fost testată în prezența moDC-urilor și a celulelor T CD8⁺ totale de la donatori sănătoși nepotriviți. După 6 zile de cultivare în prezența moleculelor testate, secreția de molecule efectoare IL-2 și CD8 (perforină, granzima B și granzima A) au fost cuantificate în supernatanți.

PBMC-urile au fost purificate din pachetul de sânge pentru afereză trombocitară folosind o soluție Lymphoprep urmând instrucțiunile producătorului (StemCell). Toate limfocitele T CD8⁺ au fost purificate din PBMC folosind un kit Miltenyi și utilizate proaspete. Monocitele pozitive CD14 au fost purificate folosind un kit de margele CD14⁺ (Miltenyi) și folosite proaspete.

MoDC-urile au fost obținute prin cultivarea monocitelor CD14⁺ în RPMI1640 plus 10% FBS și Pen/Strep (LifeTech) în prezența a 50 ng/mL de IL-4 și 100 ng/mL de GM-CSF (Miltenyi) timp de 6 zile la 2×10^6 celule/ml. În ziua 3, s-au adăugat 10 ml de mediu proaspăt care conține citokine. Fenotipul (CD14, CD1a, HLADR, PD-L1) a fost evaluat în ziua 7 de diferențiere prin FACS.

10000 moDC-uri au fost cultivate cu 50000 celule T CD8⁺, în prezența moleculelor testate, în 96 godeuri cu fund în formă de U (în godeuri triplete) în mediu RPMI complet timp de 6 zile. La sfârșitul culturii, supernatanții au fost imediat congelați și depozitați pentru cuantificarea factorului secretat.

IL-2, perforina, granzima A și granzima B au fost cuantificate în supernatanți folosind tehnologia Luminex. Date exemplificative sunt prezentate în **Figura 13**.

Figura 13 indică faptul că proteina de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87) a prezentat o creștere a secreției de IL-2, perforină, granzime B și granzime A în comparație cu o concentrație echimolară a unui anticorp PD-L1 de referință (SECV ID NR: 26 și 27), un anticorp CD137 de referință (SECV ID NR: 28 și 29), sau cocktailul celor doi la 10 $\mu\text{g/mL}$ (N=4). Datele sugerează în plus că proteina de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87) are activitate asupra celulelor T CD8⁺ citotoxice.

Exemplul 16. Evaluarea activității funcționale *in vivo* într-un model de șoarece xenogrefă grefat cu PBMC-uri umane

Pentru a investiga *in vivo* activitatea proteinelor de fuziune furnizate, se va utiliza modelul de șoarece xenogrefă derivat din linia celulară. În consecință, o linie de celule canceroase umane va fi implantată subcutanat la șoareci femele NOG cu deficiență imună, eliberați la vârsta de 4-6 săptămâni cu cel puțin 1 săptămână de carantină. După ce tumorile au ajuns la volume de aproximativ 80-100 mm³, șoarecii vor fi înlocuitori cu PBMC umane. Compușii de testat vor fi injectați de cel puțin trei ori, iar creșterea și activitatea tumorii vor fi măsurate în mod constant. După ce se ajunge la sfârșitul studiului, șoarecii vor fi sacrificați. Infiltrarea intratumorală a celulelor CD3-, CD4- și CD8-pozitive va fi evaluată prin imunohistochimie. ARNscopul IFN-gamma va fi efectuat ca citire ulterioară.

Exemplul 17. Analiza epitopului proteinelor de fuziune

Pentru a evalua epitopii pe care proteinele de fuziune îi recunosc și dacă sunt relevante clinic, a fost utilizat un format ELISA competitiv pentru a determina competiția dintre proteinele de fuziune și un anticorp CD137 de referință.

Plăcile de microtitrare au fost acoperite cu anticorpul de referință CD137 SECV ID NR: 28 și 29 în PBS (4 $\mu\text{g/mL}$) la 4°C peste noapte. Plăcile au fost spălate de cinci ori după fiecare etapă de incubare cu 100 μL PBS-0,05%T (PBS suplimentat cu 0,05% (v/v) Tween 20). Plăcile au fost blocate cu 2% BSA (g/v) în PBS-0,1%T (PBS suplimentat cu 0,1% (v/v) Tween 20) timp de 1 oră la temperatura camerei și ulterior spălate din nou. Proteine de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87 și SECV ID NR: 86 și 91), muteina de lipocalină specifică CD137 (SECV ID NR: 42), anticorpul de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29) și un control de anticorpi (SECV ID NR: 86 și 87) la diferite concentrații au fost amestecați cu 1 nM de CD137 Fc uman de fuziune biotinitat (huCD137-Fc-bio) ca trasor și incubat timp de 1 oră la temperatura camerei. Amestecuri de molecule de testare și trasor au fost adăugate pe plăci și incubate timp de 20 de minute la temperatura camerei, urmate de cinci etape de spălare cu 100 μL PBS-0,05%T. Ulterior, o diluție 1:5000 de ExtrAvidin-HRP (Sigma-Aldrich) în PBS-0,1%T-2%BSA a fost adăugată în godeuri și incubată timp de 1 oră. După o etapă suplimentară de spălare, substrat HRP fluorogen (QuantaBlu, Thermo) a fost adăugat la fiecare godeu, iar intensitatea fluorescenței a fost detectată folosind un cititor de microplăci cu fluorescență.

Datele de concurență pentru un experiment exemplar sunt afișate în **Figura 14**, unde axa x reprezintă concentrația moleculei de testare și axa y reprezintă concentrația măsurată a moleculei în urmă. Datele au fost potrivite cu o curbă sigmoidală 1:1, unde valoarea IC₅₀ și semnalul maxim au fost

parametri liberi, iar panta a fost fixată la unitate. Rezultatele demonstrează că proteinele de fuziune exemplare (SECV ID NR: 90 și 87 și SECV ID NR: 86 și 91) concurează cu anticorpul CD137 SECV ID NR: 28 și 29 pentru legarea la CD137, sugerând că proteinele de fuziune leagă epitopii suprapusi cu anticorp.

5 **Tabelul 10. Competiția proteinelor de fuziune**

SECV ID NR	IC ₅₀ [nM]
90 și 87	1,10
86 și 91	0,99
28 și 29	0,20
42	2,60

Exemplul 18. Evaluarea activării celulelor T utilizând un biotest de blocare PD-1/PD-L1

Potențialul proteinelor de fuziune selectate de a bloca suprimarea mediată de PD-1/PD-L1 a fost evaluat folosind celule T Jurkat PD-1-NFAT-luc (o linie de celule Jurkat proiectată pentru a exprima PD-1 și gena *luc* (gena luciferazei de licurici) condusă de un element de răspuns NFAT (NFAT-RE)), co-cultivată cu celule PD-L1 aAPC/CHO-K1 (celule CHO-K1 care exprimă PD-L1 uman și o proteină de suprafață celulară concepută pentru activarea TCR-urilor înrudite într-o manieră independentă de antigen). În acest biotest, când celulele T PD-1-NFAT-luc Jurkat și celulele PD-L1 aAPC/CHO-K1 sunt co-cultivate, interacțiunea PD-1/PD-L1 inhibă semnalizarea TCR și luminiscenta mediată de NFAT-RE. Adăugarea unui agent de blocare PD-1/PD-L1, cum ar fi proteinele de fuziune specifice pentru CD137 și PD-L1 așa cum este descris aici, eliberează semnalul inhibitor și are ca rezultat activarea TCR și luminiscenta mediată de NFAT-RE.

10 Celulele PD-L1 aAPC/CHO-K1 au fost crescute în mediu Ham's F12 suplimentat cu 10% FCS și placcate la $8,00 \times 10^3$ celule per godeu și lăsate să adere peste noapte la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5%. A doua zi, mediul de cultură a fost aruncat. $1,00 \times 10^4$ celule T PD-1-NFAT-luc Jurkat au fost adăugate la fiecare godeu, urmat de adăugarea diferitelor concentrații, de obicei variind de la 0,005 nM la 50 nM, a unei proteine de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87) sau a unui anticorp PD-L1 (SECV ID NR: 86 și 87 sau SECV ID NR: 26 și 27). Plăcile au fost acoperite cu un sigiliu permeabil la gaz și incubate la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5%. După 6 ore, 30 μL de reactiv Bio-Glo™ a fost adăugat în fiecare godeu și semnalul bioluminescent a fost cuantificat folosind un luminometru. Analiza curbei logistice cu patru parametri a fost efectuată cu GraphPad Prism® pentru a calcula valori EC₅₀ care sunt rezumate în **Tabelul 11**. Testul a fost efectuat în triplicat.

Rezultatele unui experiment reprezentativ sunt prezentate în **Figura 15**. Datele demonstrează că proteina de fuziune testată inhibă blocarea PD-1/PD-L1 și activează celulele T într-o manieră dependentă de doză, cu o valoare EC₅₀ comparabilă cu cea a unui anticorp PD-L1 (SECV ID NR: 86 și 87 sau SECV ID NR: 26 și 27). Ca martori negativi, nici anticorpul de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29) sau anticorpul de control izotip (SECV ID NR: 24 și 25) nu conduc la o creștere a semnalului de luminescență.

Tabelul 11. Evaluarea activării celulelor T utilizând un biotest de blocare PD-1/PD-L1

SECV ID NR	EC ₅₀ [nM]
90 și 87	0,49
86 și 91	0,58
28 și 29	0,46

35 **Exemplul 19. Evaluarea activării celulelor T utilizând PBMC umane**

Un test suplimentar de celule T a fost folosit pentru a evalua capacitatea proteinelor de fuziune selectate de a co-stimula răspunsurile celulelor T, în care proteinele de fuziune la diferite concentrații au fost adăugate la PBMC umane stimulate cu SEB și incubate timp de 3 zile la 37°C. Nivelurile de secreție de IL-2 au fost măsurate în supernatanți.

40 PBMC-urile de la donatori voluntari sănătoși au fost izolate și depozitate așa cum este descris în Exemplul 11. Pentru test, PBMC-urile au fost dezghețate și păstrate în medii de cultură (RPMI 1640, Life Technologies) suplimentate cu 10% FCS și 1% penicilină-streptomicina (Life Technologies) pentru 24 ore la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5%.

Următoarea procedură a fost efectuată folosind triplicate pentru fiecare condiție experimentală: 45 $2,5 \times 10^4$ PBMC-uri au fost incubate în fiecare godeu al unei plăci de cultură de țesut cu fund plat cu 384

de godeuri în mediu de cultură. O serie de diluții a unei proteine de fuziune selectate (SECV ID NR: 90 și 87), blocul de construcție PD-L1 anticorp (SECV ID NR: 86 și 87), un anticorp de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29) utilizat singur sau în combinație cu un anticorp de referință PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27), sau un control izotip (SECV ID NR: 24 și 25), de obicei variind de la 0,0002 la 10 nM și s-au adăugat 0,1 ng/ml SEB la godeurile respective. Plăcile au fost acoperite cu un sigiliu permeabil la gaz (4titude) și incubate la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5% timp de trei zile. Ulterior, IL-2 din supernatant a fost evaluată așa cum este descris în **Exemplul 11**.

Rezultatele unui experiment reprezentativ sunt prezentate în **Figura 16**. Valorile CE₅₀ ale moleculelor de testare pentru inducerea secreției de IL-2 sunt rezumate în **Tabelul 12**. Proteina de fuziune bispecifică a SECV ID NR: 90 și 87 induce o creștere puternică dependentă de doză a secreției de IL-2, la niveluri mai mari în comparație cu anticorpul PD-L1, anticorpul de referință CD137 și cocktailul PD de referință - anticorpi L1 și CD137, precum și scade valoarea EC₅₀ efectivă relativ la anticorpii PD-L1 și CD137 utilizați singuri sau în combinație.

Tabelul 12. Evaluarea activării celulelor T folosind PBMC-uri umane

Donator	EC ₅₀ [nM]			
	SECV ID NR: 90 și 87	SECV ID NR: 86 și 87	SECV ID NR: 26 și 27	SECV ID NR: 28 și 29 + SECV ID NR: 86 și 87
#1	0,019	0,061	0,250	0,279
#2	0,026	0,057	0,134	0,089

Exemplul 20. Evaluarea activării celulelor T dependente de PD-L1 indusă de proteinele de fuziune

Costimularea celulelor T dependentă de ȳinta PD-L1 de către proteinele de fuziune a fost analizată în continuare utilizând un test de activare a celulelor T. Proteinele de fuziune au fost aplicate la diferite concentrații celulelor T stimulate anti-CD3, co-cultivate cu celule Flp-In-CHO transfectate cu PD-L1 umane sau transfectate simulat. Nivelurile de secreție de IL-2 au fost măsurate în supernatanți.

PBMC de la donatori voluntari sănătoși au fost izolați din straturile Buffy așa cum este descris în **Exemplul 11**. Limfocitele T au fost purificate în continuare și stocate așa cum este descris în **Exemplul 12**.

Pentru test, celulele T au fost dezghețate și păstrate în mediu de cultură (RPMI 1640, Life Technologies) suplimentat cu 10% FCS și 1% penicilină-streptomicina (Life Technologies) peste noapte la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5%.

Următoarea procedură a fost efectuată folosind triplicate pentru fiecare condiție experimentală: plăcile de cultură de țesut cu fund plat au fost pre-acoperite cu 0,25 μg/ml anticorp anti-CD3 timp de 2 ore la 37°C și apoi spălate de două ori cu PBS. Celulele CHO, transfectate cu PD-L1 uman sau transfectate simulat, au fost tratate timp de 30 min cu 30 μg/ml mitomicină C (Sigma Aldrich) pentru a bloca proliferarea. Celulele tratate cu mitomicină au fost apoi spălate de două ori cu PBS și placcate la 1,0 × 10⁷ celule per godeu în mediu de cultură pentru a permite aderența peste noapte la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5%. Celulele CHO fuseseră înainte crescute în condiții standard, detașate folosind Accutase (PAA Laboratories) și resuspendate în mediu de cultură.

În următoarele zile, 8,33 × 10³ celule T per godeu au fost adăugate la celulele CHO. O serie de diluții ale unei proteine de fuziune exemplificative SECV ID NR: 90 și 87, anticorpul PD-L1 bloc (SECV ID NR: 86 și 87), anticorpul de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29) și un cocktail de anticorp de referință PD-L1 (SECV ID NR: 26 și 27) și anticorp de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29), sau un control izotip (SECV ID NR: 24 și 25), de obicei variind de la 0,003 nM la 50 nM, au fost adăugate la godeurile corespunzătoare. Plăcile au fost acoperite cu un sigiliu permeabil la gaz și incubate la 37°C într-o atmosferă de CO₂ umidificat 5% timp de 2 zile.

După 2 zile de co-cultură, nivelurile de IL-2 din supernatant au fost evaluate așa cum este descris în **Exemplul 11**.

Date exemplificative sunt prezentate în **Figura 17**. Co-cultivarea celulelor Pan T cu celule CHO transfectate cu PD-L1 uman în prezența proteinei de fuziune (SECV ID NR: 90 și 87 și SECV ID NR: 86 și 91) a condus la o secreție de IL-2 puternic dependentă de doză în comparație cu controlul izotipului hIgG4 și este mult mai puternic decât la anticorpii de referință, unde a fost observată doar o ușoară creștere a secreției de IL-2 pentru anticorpul de referință CD137 sau cocktailul anticorpului de referință CD137 și anticorpului de referință PD-L1. La co-cultivarea cu celule CHO transfectate simulat (PD-L1 negativ), numai anticorpul de referință CD137 și cocktailul anticorpului de referință CD137 și anticorpului de referință PD-L1 au prezentat o ușoară creștere dependentă de doză a secreției de IL-2. Rezultatele ilustrează faptul că activarea celulelor T de către proteinele de fuziune este dependentă de PD-

L1, față de anticorpusul de referință CD137 (SECV ID NR: 28 și 29) a arătat co-stimulare mediată de celule T CD137, indiferent de prezența sau absența celulelor țintă.

Exemplul 21. Farmacocinetica proteinelor de fuziune la șoareci

Analize ale farmacocineticii proteinelor de fuziune reprezentative (SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91) au fost efectuate la șoareci. Șoareci masculi CD-1 în vârstă de aproximativ 5 săptămâni (3 șoareci per punct de timp; Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH) au fost injectați într-o venă a cozii cu o proteină de fuziune la o doză de 10 mg/kg. Articolele de testat au fost administrate ca bolus folosind un volum de 5 ml/kg. Probele de plasmă de la șoareci au fost obținute la momentele de timp de 5 min, 1 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 4 z, 8 z, 14 z, 21 z și 28 z. S-a colectat suficient sânge integral - luat sub anestezie cu izofluran - pentru a obține cel puțin 100 μ L plasmă Li-Heparină per animal și timp. Nivelurile de medicamente au fost detectate utilizând un Sandwich ELISA care detectează construcția bispecifică completă prin intermediul țințelor PD-L1 și CD137. Datele au fost ajustate folosind un model cu două compartimente folosind software-ul Prism GraphPad 5.

Figura 18 prezintă grafice ale concentrației plasmatice în timp pentru proteinele de fuziune SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 86 și 91, SECV ID NR: 92 și 87, SECV ID NR: 86 și 93, SECV ID NR: 94 și 87 și SECV ID NR: 90 și 91, reprezentate grafic împreună cu valorile obținute pentru anticorpusul PD-L1 bloc (SECV ID NR: 86 și 87) ca referință. Farmacocinetica a arătat similar în toate cazurile. Pornind de la o concentrație plasmatică de aproximativ 200 μ g/mL, nivelurile plasmatice au scăzut la un nivel de aproximativ 50 μ g/mL în decurs de 48 de ore, apoi scad în continuare într-un ritm mult mai lent până la un nivel de aproximativ 10 μ g/mL la sfârșitul experimentului după 28 de zile. O analiză necompartimentală a fost aplicată acestor date. Timpurile de înjumătățire terminale sunt rezumate în **Tabelul 13**.

Datele demonstrează că proteinele de fuziune au timpuri de înjumătățire terminale lungi, asemănătoare anticorpilor, la șoareci. Deoarece testul folosit pentru a determina concentrațiile plasmatice ale proteinelor de fuziune necesită o activitate reținută atât față de PD-L1 cât și față de CD137, rezultatul demonstrează, de asemenea, că moleculele bispecifice rămân intacte pe parcursul a 28 de zile.

Tabelul 13. Timpurile de înjumătățire terminale la șoareci au fost determinate folosind o analiză necompartimentală

SECV ID NR	Timp de înjumătățire terminal [h]
90 și 87	295
92 și 87	346
86 și 93	332
94 și 87	209
90 și 91	250
86 și 87	390

Exemplul 22. Farmacocinetica proteinelor de fuziune la șoareci

O analiză a farmacocineticii unei proteine de fuziune reprezentative SECV ID NR: 90 și 87 a fost efectuată la șoareci și comparată cu două proteine de fuziune care leagă CD137 și PD-L1 descrise anterior (SECV ID NR: 147 și SECV ID NR: 148). Șoareci masculi CD-1 în vârstă de aproximativ 5 săptămâni (2 șoareci per punct de timp; Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH) au fost injectați într-o venă a cozii cu molecula respectivă la o doză de 2 mg/kg. Probele de plasmă de la șoareci au fost obținute la momentele de timp de 5 min, 24 h, 168 h și 336 h. S-a colectat suficient sânge integral - luat sub anestezie cu izofluran - pentru a obține cel puțin 30-50 μ L plasmă de Li-heparină per animal și timp.

Nivelurile plasmatice ale medicamentului au fost apoi analizate cu ELISA. HuCD137-His (CD137 uman cu o etichetă de polihistidină C-terminală) a fost dizolvat în PBS (1 μ g/mL) și acoperit peste noapte pe plăci de microtitrare la 4°C. Placa a fost spălată după fiecare etapă de incubare cu 80 μ L PBS suplimentat cu 0,05% (v/v) Tween 20 de cinci ori. Plăcile au fost blocate cu PBS/BSA/Tween (PBS care conține 2% BSA (g/v) și 0,1% (v/v) Tween 20) timp de 1 oră la temperatura camerei și ulterior spălate. Probele de plasmă au fost diluate în PBS/BSA/Tween până la o concentrație de plasmă de 20%, adăugate în godeuri și incubate timp de 1 oră la temperatura camerei. A urmat un alt pas de spălare. Agenții legați aflați în studiu au fost detectați după 1 oră de incubare cu un amestec de PD-L1 uman biotinitat și Streptavidin SULFOTAG (MesoScale Discovery) la 1 μ g/mL fiecare diluat în PBS care

conține 2% BSA (g/v) și 0,1% (v/v) Tween 20. După o etapă suplimentară de spălare, s-au adăugat 35 μ L tampon de citire la fiecare godeu și semnalul de electrochimiluminiscență (ECL) al fiecărui godeu a fost citit folosind un cititor Mesoscale Discovery. Datele au fost transferate în Excel pentru analiză și cuantificare. A fost pregătită o curbă de calibrare cu diluții standard de proteine.

Figura 19 prezintă grafice ale concentrației plasmatice în timp pentru SECV ID NR: 90 și 87, SECV ID NR: 147 și SECV ID NR: 148. SECV ID NR: 90 și 87 prezintă un profil farmacocinetic favorabil sau o farmacocinetică asemănătoare anticorpilor, în timp ce SECV ID NR: 147 și SECV ID NR: 148 nu. După cum este descris aici, un profil farmacocinetic favorabil sau o farmacocinetică asemănătoare anticorpilor poate fi considerat a fi atins dacă % din c_{max} a fost peste 10 % după 336 de ore.

VI. REFERINȚE NEBREVETATE

1. GATO-CANAS, M., ZUAZO, M., ARASANZ, H., IBANEZ-VEA, M., LORENZO, L., FERNANDEZ-HINOJAL, G., VERA, R., SMERDOU, C., MARTISOVA, E., AROZARENA, I., WELLBROCK, C., LLOPIZ, D., RUIZ, M., SAROBE, P., BRECKPOT, K., KOCHAN, G. & ESCORS, D. 2017. PD1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep*, 20, 1818-1829.
2. KARWACZ, K., BRICOGNE, C., MACDONALD, D., ARCE, F., BENNETT, C. L., COLLINS, M. & ESCORS, D. 2011. PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8+ T cells. *EMBO Mol Med*, 3, 581-92.
3. ARASANZ, H., GATO-CANAS, M., ZUAZO, M., IBANEZ-VEA, M., BRECKPOT, K., KOCHAN, G. & ESCORS, D. 2017. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*, 8, 51936-51945.
4. PATSOUKIS, N., BARDHAN, K., CHATTERJEE, P., SARI, D., LIU, B., BELL, L. N., KAROLY, E. D., FREEMAN, G. J., PETKOVA, V., SETH, P., LI, L. & BOUSSIOTIS, V. A. 2015. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Not Commun*, 6, 6692.
5. XU-MONETTE, Z. Y., ZHANG, M., LI, J. & YOUNG, K. H. 2017. PD-1/PD-L1 Blockade: Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response? *Front Immunol*, 8, 1597.
6. LI, S. Y. & LIU, Y. 2013. Immunotherapy of melanoma with the immune costimulatory monoclonal antibodies targeting CD137. *Clin Pharmacol*, 5, 47-53.
7. SNELL, L. M., LIN, G. H., MCPHERSON, A. J., MORAES, T. J. & WATTS, T. H. 2011. T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. *Immunol Rev*, 244, 197-217.
8. WYZGOL, A., MULLER, N., FICK, A., MUNKEL, S., GRIGOLEIT, G. U., PFIZENMAIER, K. & WAJANT, H. 2009. Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J Immunol*, 183, 1851-61.
9. YAO, S., ZHU, Y. & CHEN, L. 2013. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Not Rev Drug Discov*, 12, 130-46.
10. MELERO, I., BACH, N., HELLSTROM, K. E., ARUFFO, A., MITTLER, R. S. & CHEN, L. 1998. Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur J Immunol*, 28, 1116-21.
11. YANG, Y., YANG, S., YE, Z., JAFFAR, J., ZHOU, Y., CUTTER, E., LIEBER, A., HELLSTROM, I. & HELLSTROM, K. E. 2007. Tumor cells expressing anti-CD137 scfv induce a tumor-destructive environment. *Cancer Res*, 67, 2339-44.
12. ZHANG, H., KNUTSON, K. L., HELLSTROM, K. E., DISIS, M. L. & HELLSTROM, I. 2006. Antitumor efficacy of CD137 ligation is maximized by the use of a CD137 single-chain Fv-expressing whole-cell tumor vaccine compared with CD137-specific monoclonal antibody infusion. *Mol Cancer Ther*, 5, 149-55.
13. YE, Z., HELLSTROM, I., HAYDEN-LEDBETTER, M., DAHLIN, A., LEDBETTER, J. A. & HELLSTROM, K. E. 2002. Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB. *Not Med*, 8, 343-8.
14. MARTINET, O., DIVINO, C. M., ZANG, Y., GAN, Y., MANDELI, J., THUNG, S., PAN, P. Y. & CHEN, S. H. 2002. T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1BB ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicate liver metastases of breast cancer. *Gene Ther*, 9, 786-92.
15. YE, Q., SONG, D. G., POUSSIN, M., YAMAMOTO, T., BEST, A., LI, C., COUKOS, G. & POWELL, D. J., JR. 2014. CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. *Clin Cancer Res*, 20, 44-55.
16. CHACON, J. A., WU, R. C., SUKHUMALCHANDRA, P., MOLLDREM, J. J., SARNAIK, A., PILON-THOMAS, S., WEBER, J., HWU, P. & RADVANYI, L. 2013. Co-stimulation through 4-

1BB/CD137 improves the expansion and function of CD8(+) melanoma tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive T-cell therapy. *PLoS One*, 8, e60031.

17. FISHER, T. S., KAMPERSCHROER, C., OLIPHANT, T., LOVE, V. A., LIRA, P. D., DOYONNAS, R., BERGQVIST, S., BAXI, S. M., ROHNER, A., SHEN, A. C., HUANG, C., SOKOLOWSKI, S. A. & SHARP, L. L. 2012. Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity. *Cancer Immunol Immunother*, 61, 1721-33.
18. SKERRA, A. 2000. Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-50.
19. FLOWER, D. R., NORTH, A. C. & SANSOM, C. E. 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 9-24.
20. FLOWER, D. R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 318 (Pt 1), 1-14.
21. ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
22. ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10.
23. SMITH, T. F. & WATERMAN, M. S. 1981. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol*, 147, 195-7.
24. WARD, E. S., GUSSOW, D., GRIFFITHS, A. D., JONES, P. T. & WINTER, G. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 341, 544-6.
25. HOLLIGER, P., PROSPERO, T. & WINTER, G. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6444-8.
26. JOHNSON, G. & WU, T. T. 2000. Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res*, 28, 214-8.
27. EHRENMANN, F., KAAS, Q. & LEFRANC, M. P. 2010. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. *Nucleic Acids Res*, 38, D301-7.
28. BULLIARD, Y., JOLICOEUR, R., ZHANG, J., DRANOFF, G., WILSON, N. S. & BROGDON, J. L. 2014. OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcγRs, leading to antitumor efficacy. *Immunol Cell Biol*, 92, 475-80.
29. BULLIARD, Y., JOLICOEUR, R., WINDMAN, M., RUE, S. M., ETTEMBERG, S., KNEE, D. A., WILSON, N. S., DRANOFF, G. & BROGDON, J. L. 2013. Activating Fc gamma receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med*, 210, 1685-93.
30. SILVA, J. P., VETTERLEIN, O., JOSE, J., PETERS, S. & KIRBY, H. 2015. The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation. *J Biol Chem*, 290, 5462-9.
31. GLAESNER, W., VICK, A. M., MILLICAN, R., ELLIS, B., TSCHANG, S. H., TIAN, Y., BOKVIST, K., BRENNER, M., KOESTER, A., PORKSEN, N., ETGEN, G. & BUMOL, T. 2010. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. *Diabetes Metab Res Rev*, 26, 287-96.
32. DALL'ACQUA, W. F., KIENER, P. A. & WU, H. 2006. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem*, 281, 23514-24.
33. ZALEVSKY, J., CHAMBERLAIN, A. K., HORTON, H. M., KARKI, S., LEUNG, I. W., SPROULE, T. J., LAZAR, G. A., ROOPENIAN, D. C. & DESJARLAIS, J. R. 2010. Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Not Biotechnol*, 28, 157-9.
34. SHIELDS, R. L., NAMENUK, A. K., HONG, K., MENG, Y. G., RAE, J., BRIGGS, J., XIE, D., LAI, J., STADLEN, A., LI, B., FOX, J. A. & PRESTA, L. G. 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*, 276, 6591-604.
35. ALTSHULER, E. P., SEREBRYANAYA, D. V. & KATRUKHA, A. G. 2010. Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity. *Biochemistry (Mosc)*, 75, 1584-605.
36. HARLOW, E. & LANE, D. 1999. Using antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
37. HARLOW, E. & LANE, D. 1988. Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
38. LI, J., SAI, T., BERGER, M., CHAO, Q., DAVIDSON, D., DESHMUKH, G., DROZDOWSKI, B., EBEL, W., HARLEY, S., HENRY, M., JACOB, S., KLINE, B., LAZO, E., ROTELLA, F., ROUTHIER, E., RUDOLPH, K., SAGE, J., SIMON, P., YAO, J., ZHOU, Y., KAVURU, M., BONFIELD, T.,

- THOMASSEN, M. J., SASS, P. M., NICOLAIDES, N. C. & GRASSO, L. 2006. Human antibodies for immunotherapy development generated via a human B cell hybridoma technology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 3557-62.
39. KOZBOR, D. & RODER, J. C. 1983. The production of monoclonal antibodies from human lymphocytes. *Immunol Today*, 4, 72-9.
40. COLE, S. P., CAMPLING, B. G., LOUWMAN, I. H., KOZBOR, D. & RODER, J. C. 1984. A strategy for the production of human monoclonal antibodies reactive with lung tumor cell lines. *Cancer Res*, 44, 2750-3.
41. HOLLIGER, P. & HUDSON, P. J. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Not Biotechnol*, 23, 1126-36.
42. PERVAIZ, S. & BREW, K. 1987. Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J*, 1, 209-14.
43. SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
44. FLOWER, D. R. 2000. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 327-36.
45. BREUSTEDT, D. A., KORNDORFER, I. P., REDL, B. & SKERRA, A. 2005. The 1.8-A crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J Biol Chem*, 280, 484-93.
46. SCHMIDT, T. G., KOEPKE, J., FRANK, R. & SKERRA, A. 1996. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, 255, 753-66.
47. VAJO, Z. & DUCKWORTH, W. C. 2000. Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millenium. *Pharmacol Rev*, 52, 1-9.
48. FUERTGES, F. & ABUCHOWSKI, A. 1990. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *Journal of Controlled Release*, 11, 139-148.
49. DENNIS, M. S., ZHANG, M., MENG, Y. G., KADKHODAYAN, M., KIRCHHOFFER, D., COMBS, D. & DAMICO, L. A. 2002. Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J Biol Chem*, 277, 35035-43.
50. KONIG, T. & SKERRA, A. 1998. Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J Immunol Methods*, 218, 73-83.
51. OSBORN, B. L., OLSEN, H. S., NARDELLI, B., MURRAY, J. H., ZHOU, J. X., GARCIA, A., MOODY, G., ZARITSKAYA, L. S. & SUNG, C. 2002. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 540-8.
52. LOWMAN, H. B. 1997. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26, 401-24.
53. RODI, D. J. & MAKOWSKI, L. 1999. Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol*, 10, 87-93.
54. VENTURI, M., SEIFERT, C. & HUNTE, C. 2002. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J Mol Biol*, 315, 1-8.
55. BRUCKDORFER, T., MARDER, O. & ALBERICIO, F. 2004. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr Pharm Biotechnol*, 5, 29-43.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- MARLON J. HINNER ET AL: "Abstract B023: Costimulatory T-cell engagement via a novel bispecific anti-CD137 /anti-HER2 protein based on Anticalin technology", *CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH*, vol. 4, no. 1, 1 January 2016 (2016-01-01) , page B023, XP055634176, -& Marlon J Hinner ET AL: "Costimulatory T cell engagement via a novel bispecific anti-CD137/anti-HER2 protein based on Anticalin ? technology", , 18 September 2015 (2015-09-18), XP055250958, DOI: 10.1158/2326-6074.CRICIMTEATIAACR15-B023 Retrieved from the Internet: URL:http://c.eqcdn.com/pierisag/db/164/197_5/pdf/150914_CRI_Poster_postFinal.pdf [retrieved on 2016-02-17]
- EP-A1- 3 309 177
- JOHN-PAUL SILVA ET AL: "The S228P Mutation Prevents in Vivo and in Vitro IgG4 Fab-arm Exchange as Demonstrated using a Combination of Novel Quantitative Immunoassays and

Physiological Matrix Preparation", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 290, no. 9, 27 February 2015 (2015-02-27), pages 5462-5469, XP055299482, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M114.600973 cited in the application

- WO-A1-2016/177762
- WO-A1-2016/184882
- WOLFGANG GLAESNER ET AL: "Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein", DIABETES/METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS, vol. 26, no. 4, 30 April 2010 (2010-04-30), pages 287-296, XP055181624, ISSN: 1520-7552, DOI: 10.1002/dmrr.1080 cited in the application
- WO-A1-2017/215590
- WO-A1-2018/087108
- WO-A1-2019/042153
- WO-A2-2015/104406
- WO-A2-2017/123650

(57) Revendicări:

1. O proteină de fuziune care este capabilă să lege atât CD137, cât și PD-L1, în care proteina de fuziune cuprinde două subunități, în care prima subunitate cuprinde o imunoglobulină de lungime completă care este specifică pentru PD-L1 și în care a doua subunitate cuprinde o muteină de lipocalină care este specifică pentru CD137,

în care proteina de fuziune cuprinde secvențe de aminoacizi având cel puțin 90% identitate de secvență cu secvențele de aminoacizi prezentate în SECV ID NR: 90 și 87,

în care lanțul greu al imunoglobulinei cuprinde următorul set de secvențe CDR: GFSLSNYD (HCDR1, SECV ID NR: 60), IWTGGAT (HCDR2, SECV ID NR: 61) și VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3, SECV ID NR: 62) și lanțul ușor al imunoglobulinei cuprinde următorul set de secvențe CDR: QSIGTN (LCDR1, SECV ID NR: 63), YAS (LCDR2) și QQSNSWPYT (LCDR3, SECV ID NR: 64) și în care secvența de aminoacizi a muteinei de lipocalină cuprinde următorul set de resturi de aminoacizi mutante în comparație cu secvența polipeptidică liniară a hNGAL matur așa cum este prezentată în SECV ID NR: 2: Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; și Lys 134 → Tyr.

2. Proteină de fuziune conform revendicării 1, în care secvența de aminoacizi a muteinei de lipocalină are cel puțin 90% identitate de secvență cu secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 42.

3. Proteină de fuziune conform revendicării 1 sau 2, în care secvența de aminoacizi a muteinei de lipocalină cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 42.

4. Proteină de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care a doua subunitate este legată la capătul N-terminal printr-un linker la capătul C-terminal al fiecărei regiuni constante a lanțului greu (CH) a primei subunități, în care linkerul este de preferință linkerul din SECV ID NR: 13.

5. Proteină de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-4, în care imunoglobulina cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvențele de aminoacizi așa cum se arată în SECV ID NR: 77 și 82.

6. Proteină de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care imunoglobulina cuprinde un lanț greu și un lanț ușor cuprinzând secvențele de aminoacizi așa cum se arată în SECV ID NR: 86 și 87.

7. Proteină de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care imunoglobulina are un schelet IgG4, în care scheletul IgG4 are de preferință una sau mai multe dintre următoarele mutații: S228P, N297A, F234A, L235A, M428L, N434S, M252Y, S254T, și T256E, conform indexului UE Kabat.

8. Proteină de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-5 sau 7, în care proteina de fuziune cuprinde secvențe de aminoacizi având cel puțin 92%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau o identitate de secvență mai mare cu secvențele de aminoacid prezentate în SECV ID NR: 90 și 87.

9. Proteină de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-8, în care proteina de fuziune cuprinde secvențele de aminoacizi prezentate în SECV ID NR: 90 și 87.

10. Moleculă de acid nucleic care cuprinde o secvență de nucleotide care codifică proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-9, în care de preferință

(i) molecula de acid nucleic este legată operațional la o secvență reglatoare pentru a permite exprimarea respectivei molecule de acid nucleic; sau

(ii) molecula de acid nucleic este cuprinsă într-un vector sau într-un vector fagemid.

11. Celulă gazdă care conține o moleculă de acid nucleic conform revendicării 10.

12. Metodă de producere a proteinei de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-9, în care proteina de fuziune este produsă pornind de la acidul nucleic care codifică proteina de fuziune, în care proteina de fuziune este de preferință produsă într-un organism gazdă bacterian sau eucariot și este izolată din acest organism gazdă sau din cultura sa.

13. Compoziție farmaceutică care cuprinde o proteină de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-9.

14. Proteină de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-9 pentru utilizare în terapie.

15. Proteină de fuziune pentru utilizarea conform revendicării 14, în care utilizarea este în tratamentul cancerului.

Figura 1

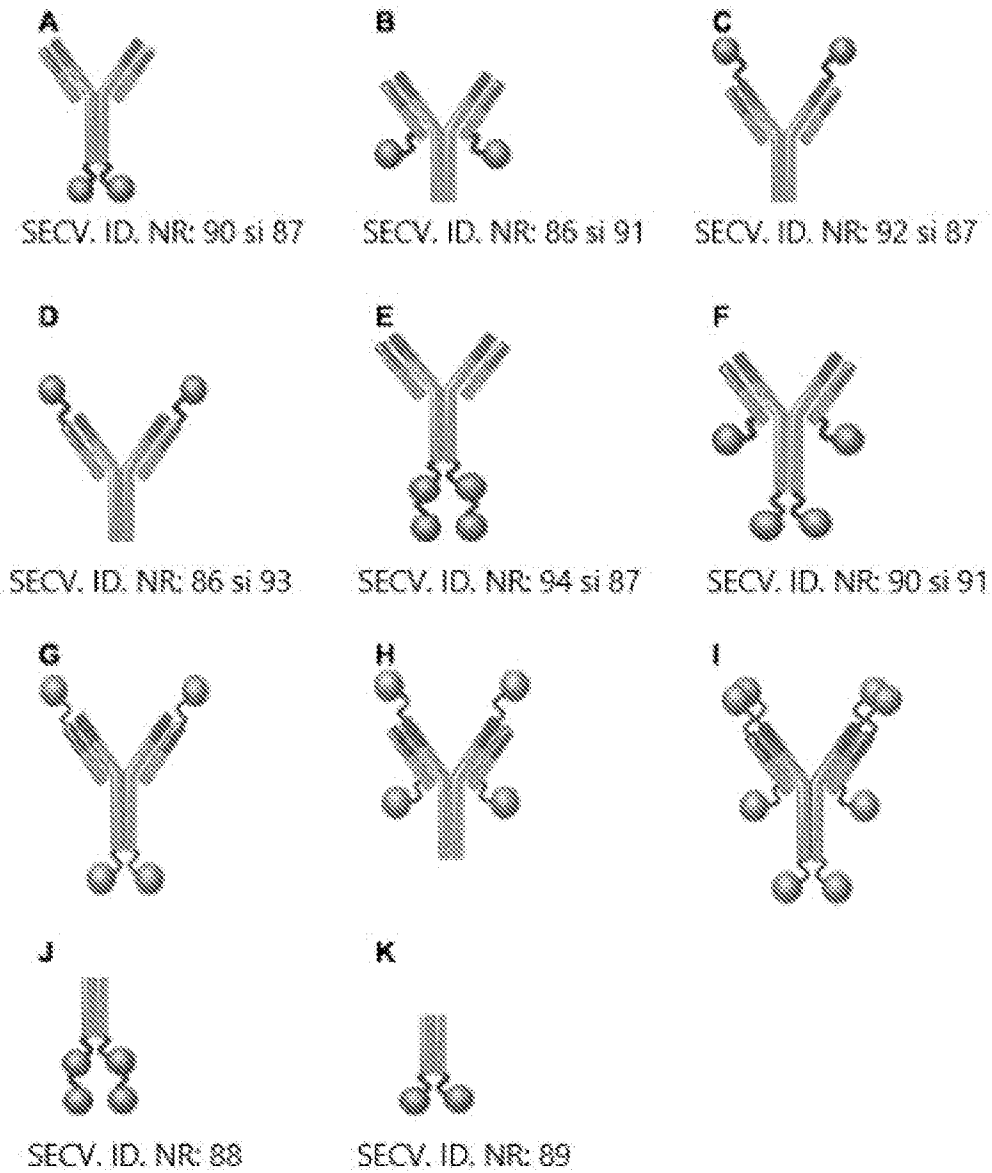
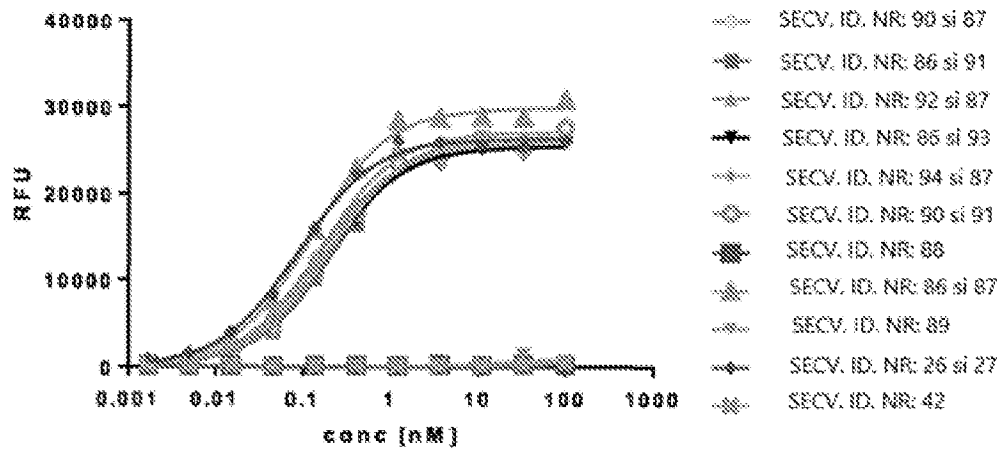


Figura 2

A. legare la PD-L1 uman



B. legare la PD-L1 cynomolgus

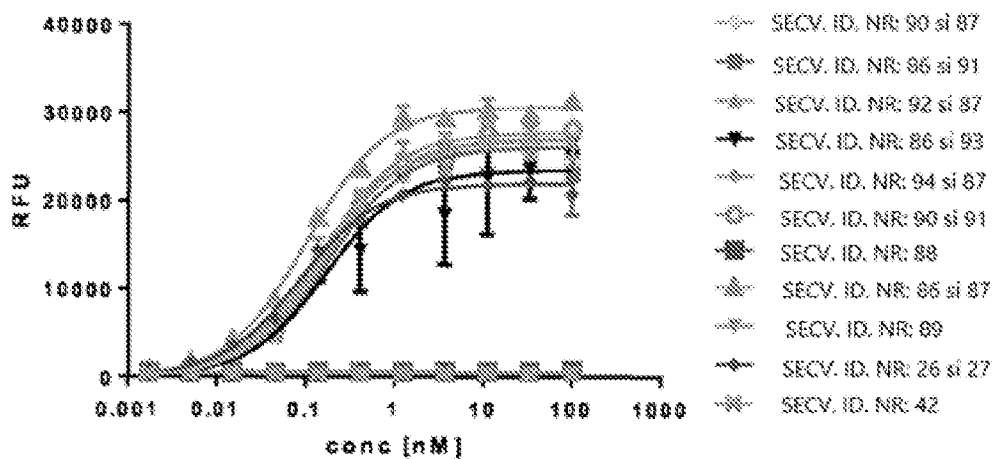
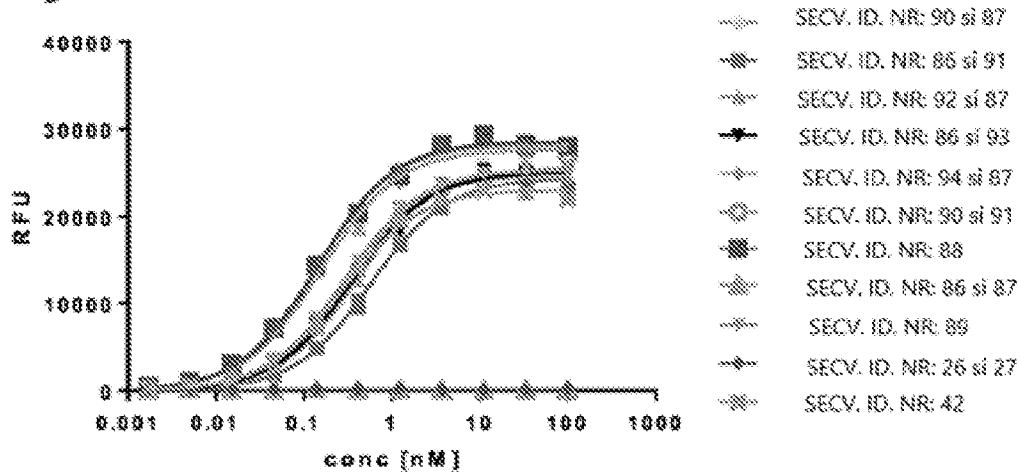


Figura 2 (Continuare)

C. legare la CD137 uman



D. legare la CD137 cynomolgus

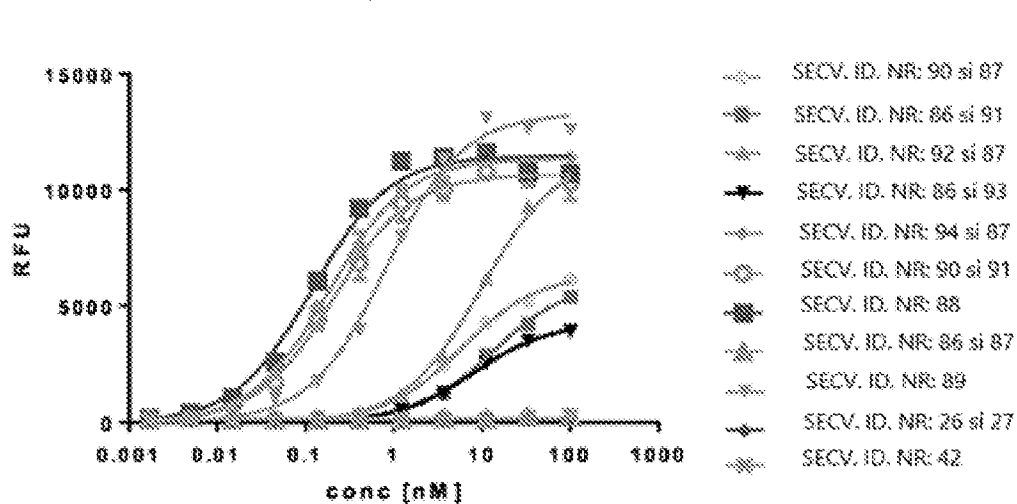
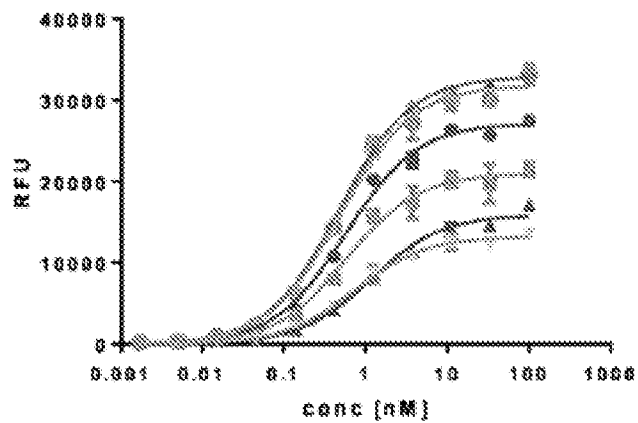
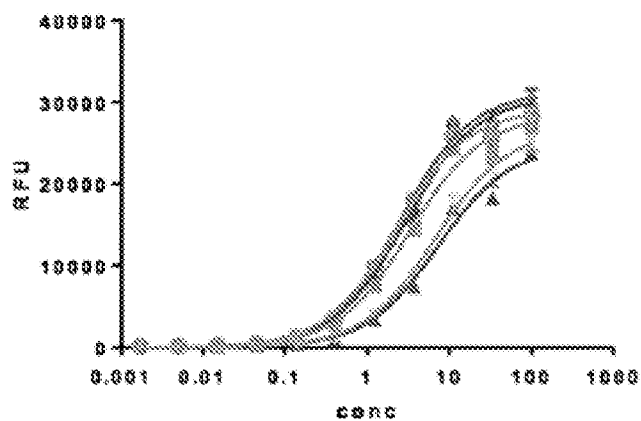


Figura 3

A. PD-L1 captură _ CD 137 detecție



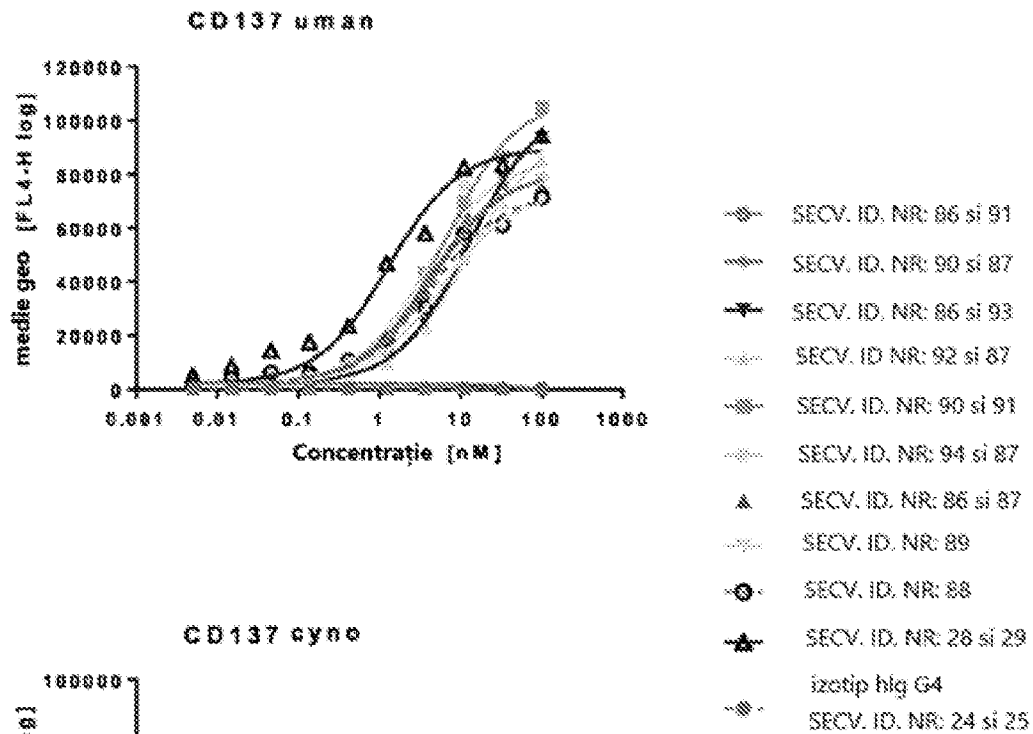
B. CD 137 _ PD-L1 detecție



- SEC. ID. NR: 90 și 87
- SEC. ID. NR: 86 și 91
- SEC. ID. NR: 92 și 87
- SEC. ID. NR: 86 și 93
- SEC. ID. NR: 94 și 87
- SEC. ID. NR: 90 și 91

Figura 4

A



B

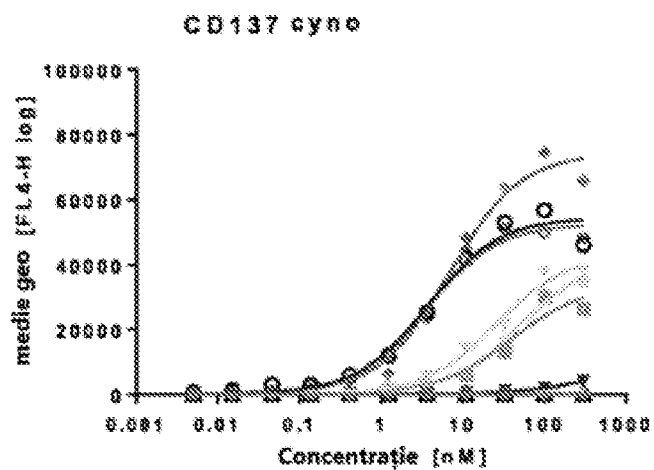
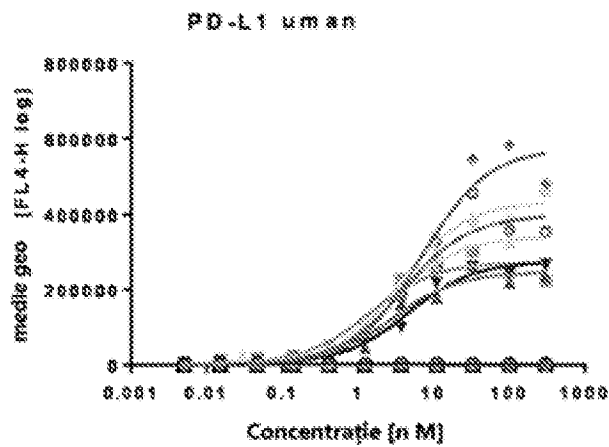
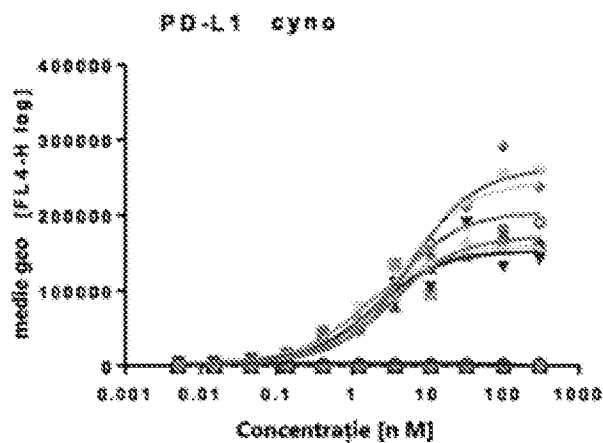


Figura 4 (Continuare)

C



D



- SEC.V. ID. NR: 86 și 91
- SEC.V. ID. NR: 90 și 87
- SEC.V. ID. NR: 86 și 93
- SEC.V. ID. NR: 92 și 87
- SEC.V. ID. NR: 90 și 91
- SEC.V. ID. NR: 94 și 87
- SEC.V. ID. NR: 86 și 87
- SEC.V. ID. NR: 89
- SEC.V. ID. NR: 88
- SEC.V. ID. NR: 28 și 29
- izotip hlg G4
- SEC.V. ID. NR: 24 și 25

E

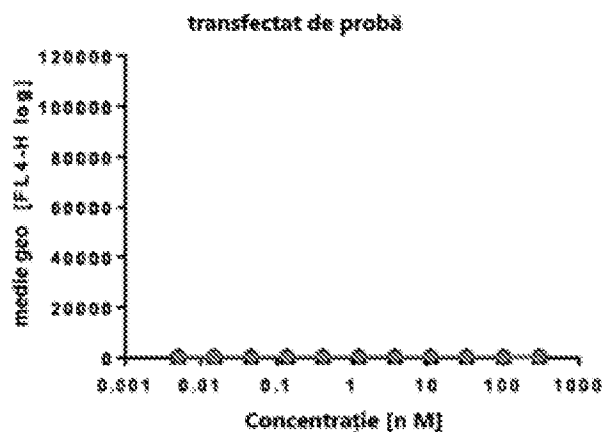


Figura 5

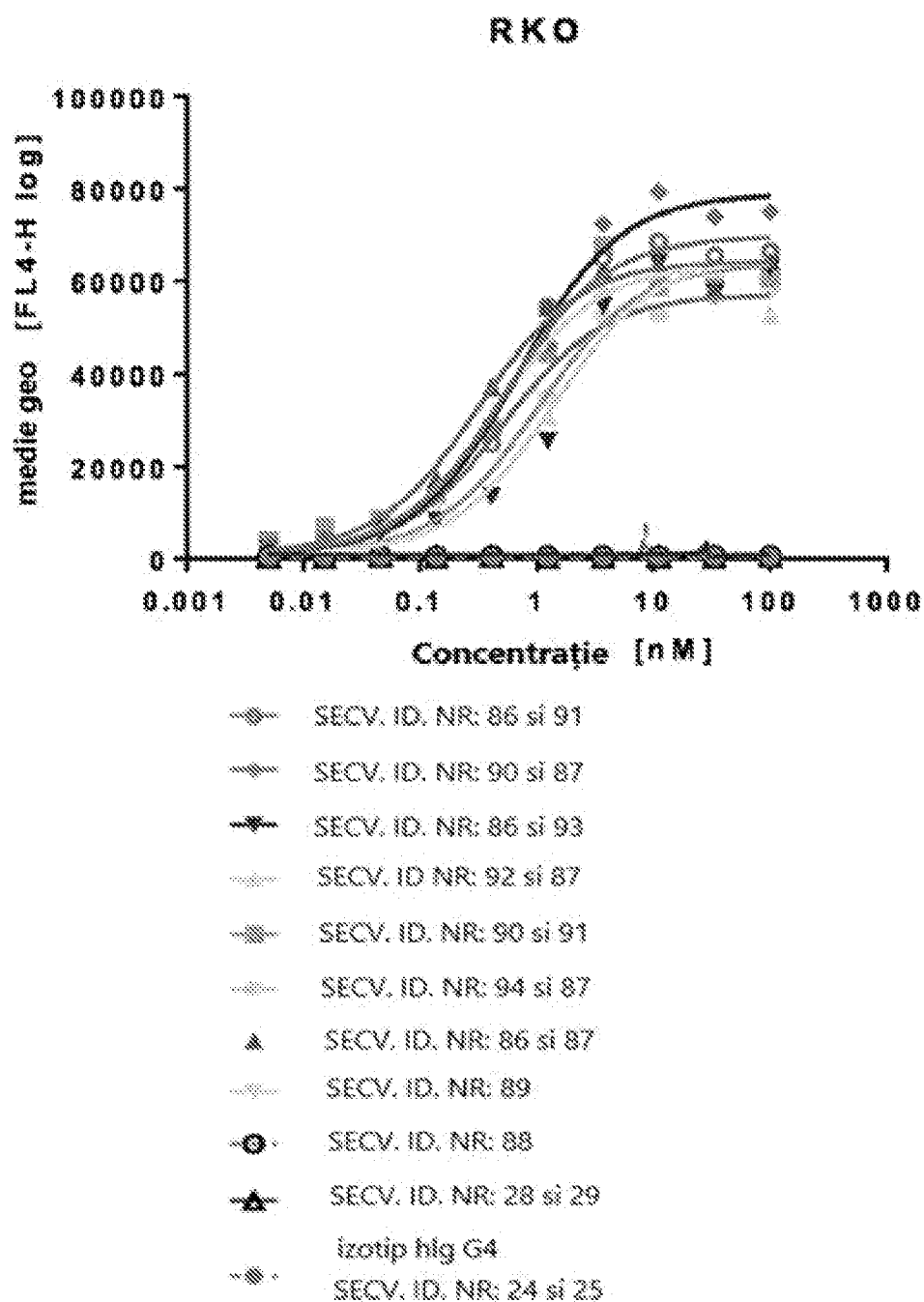
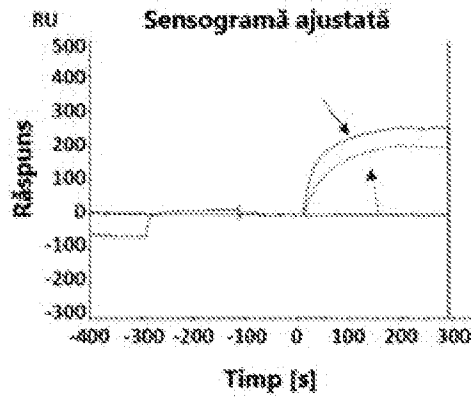
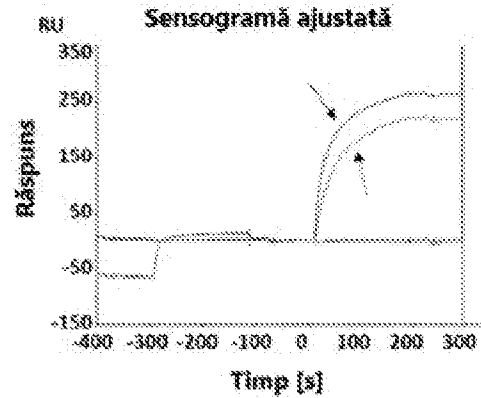


Figura 6

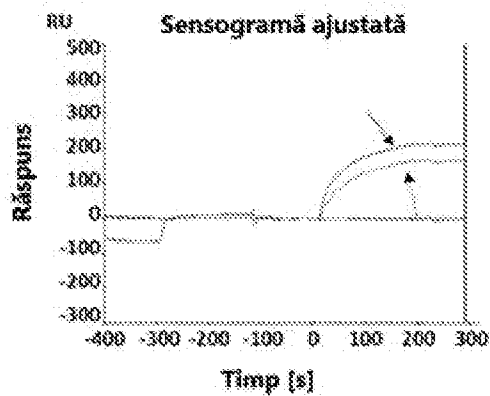
SECV. ID. NR: 90 și 87



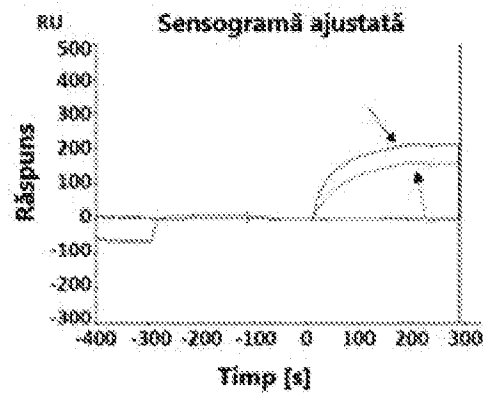
SECV. ID NR: 86 și 91



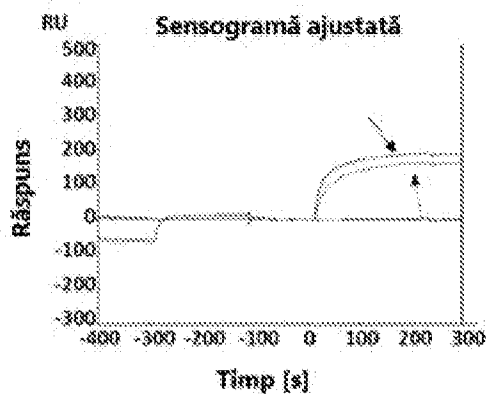
SECV. ID. NR: 92 și 87



SECV. ID. NR: 86 și 93



SECV. ID. NR: 94 și 87



SECV. ID. NR: 90 și 91

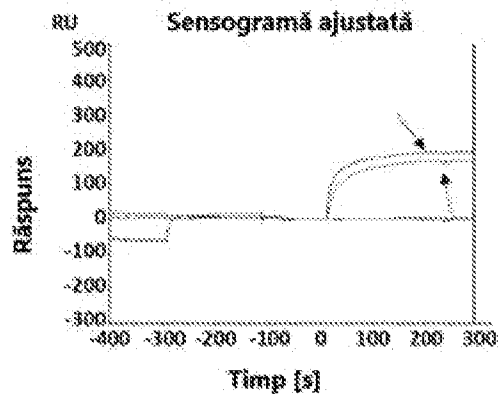


Figura 6 (Continuare)

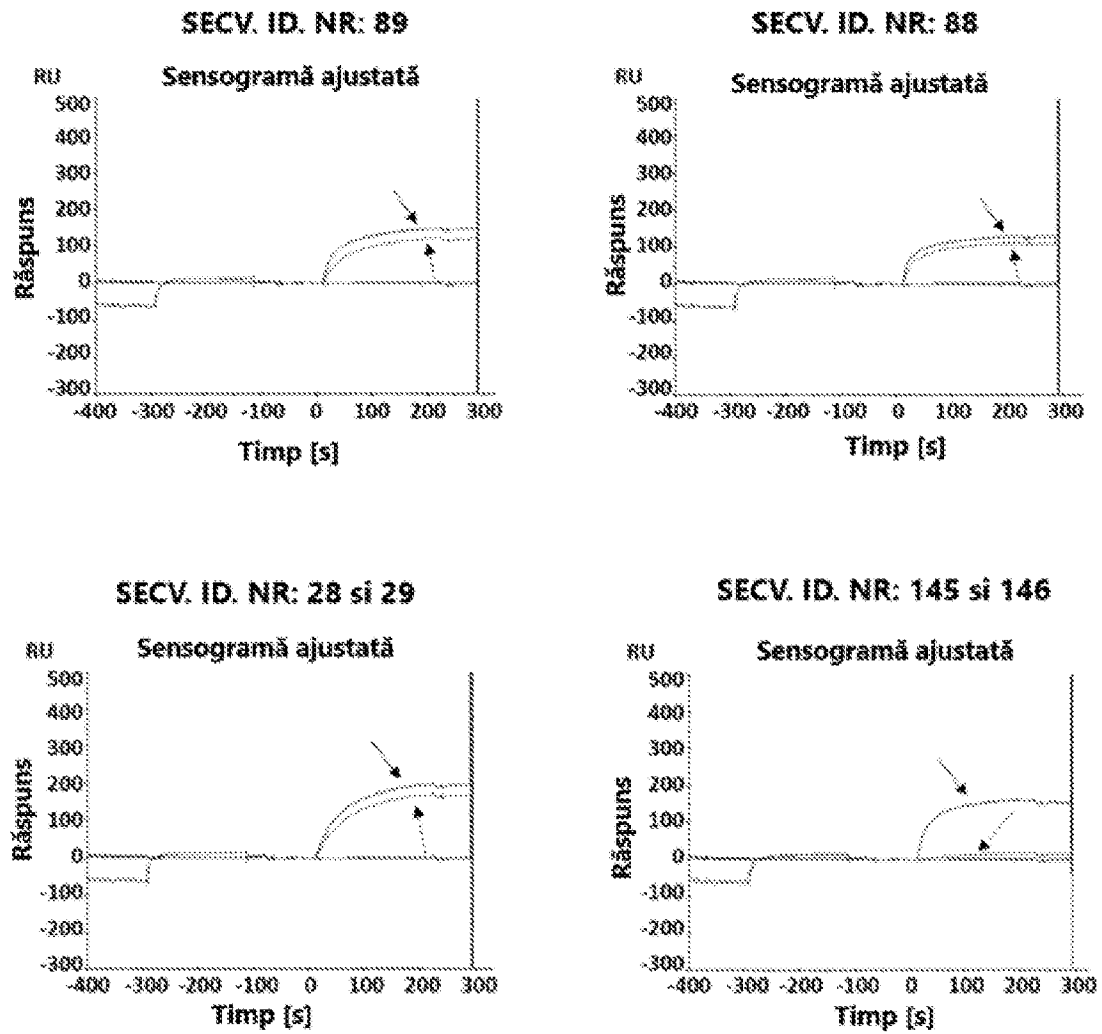
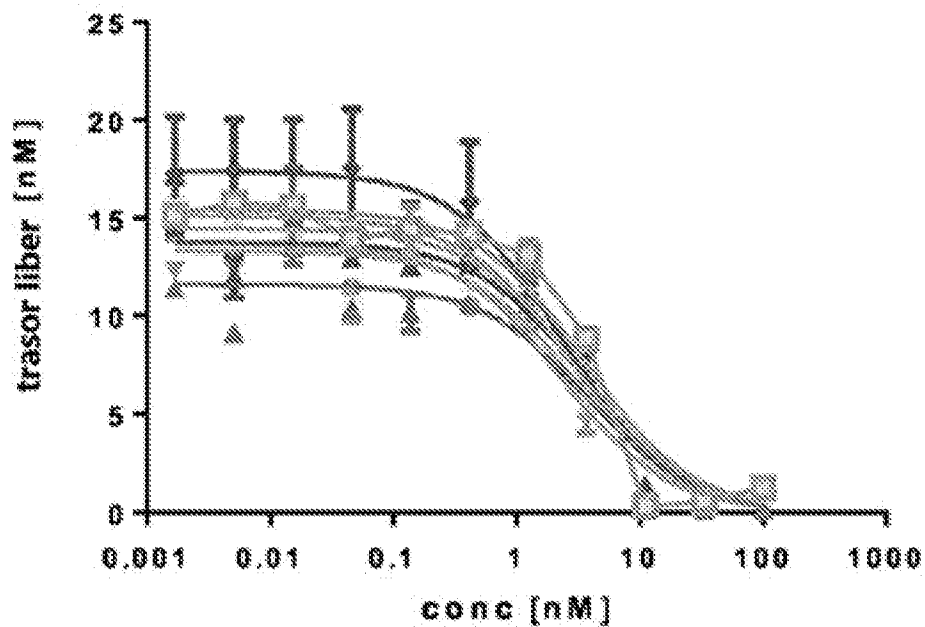


Figura 7

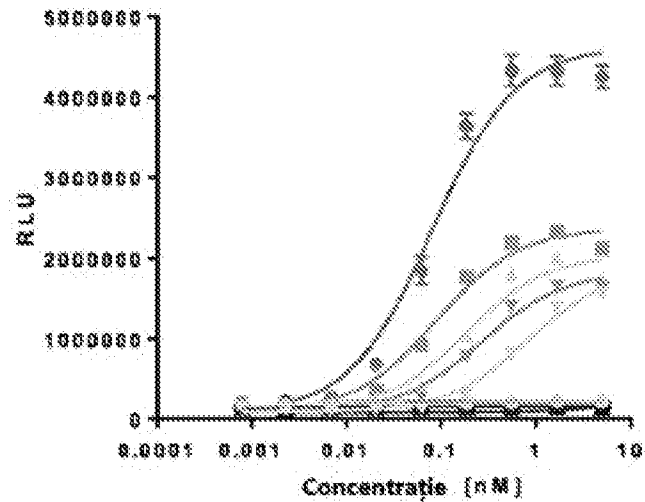


- SECV, ID, NR: 90 si 87
- SECV, ID, NR: 86 si 91
- SECV, ID, NR: 92 si 87
- SECV, ID NR: 86 si 93
- SECV, ID, NR: 94 si 87
- SECV, ID, NR: 90 si 91
- SECV, ID, NR: 26 si 27
- SECV, ID, NR: 86 si 87

Figura 8

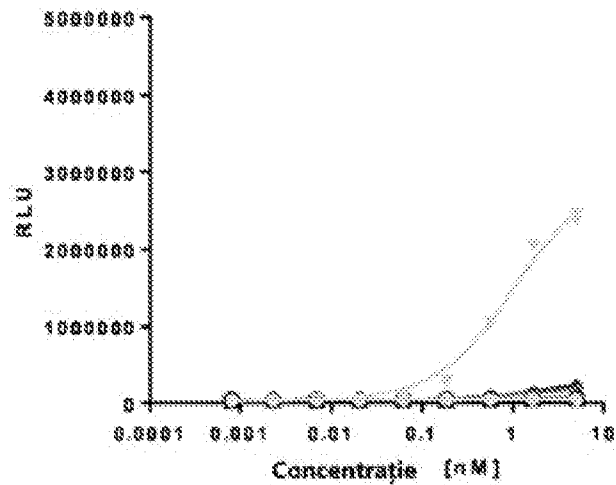
A

Răspuns Glo cu celule RKO



B

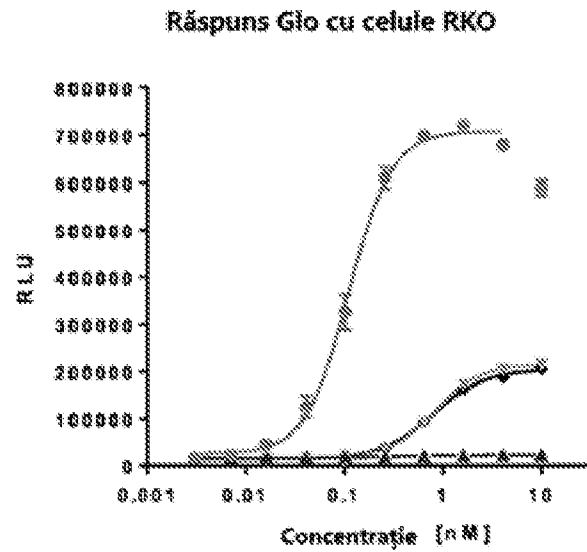
Răspuns Glo cu celule RKO



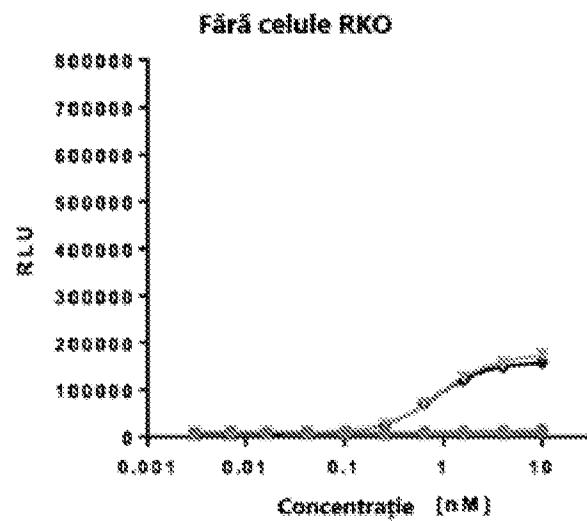
- SECV, ID. NR: 92 și 87
- SECV, ID. NR: 86 și 93
- SECV, ID. NR: 86 și 91
- SECV, ID. NR: 90 și 87
- SECV, ID. NR: 86 și 87
- SECV, ID. NR: 89
- SECV, ID. NR: 86 și 87 + SECV, ID. NR: 89
- SECV, ID. NR: 28 și 29
- SECV, ID. NR: 26 și 27
- izotip Nig G4 SECV, ID. NR: 24 și 25

Figura 8 (Continuare)

C



D



- ◆ SECV. ID. NR: 90 si 87
- ★ SECV. ID. NR: 86 si 87
- ◆ SECV. ID. NR: 28 si 29
- ◆ SECV. ID. NR: 26 si 27 + SECV. ID. NR: 28 si 29
- ◆ izotip hlg G4 SECV. ID. NR: 24 si 25

Figura 9

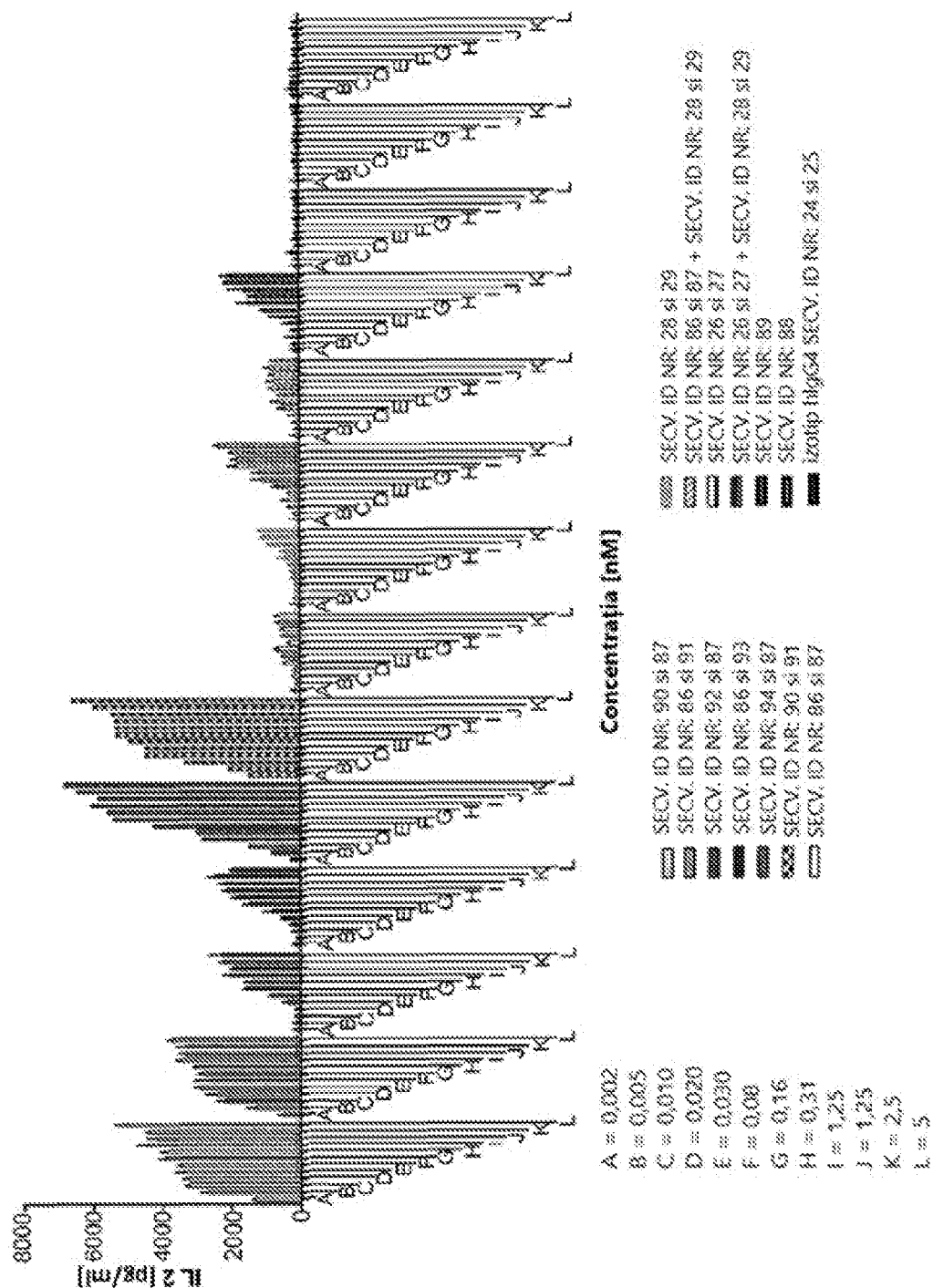


Figura 10

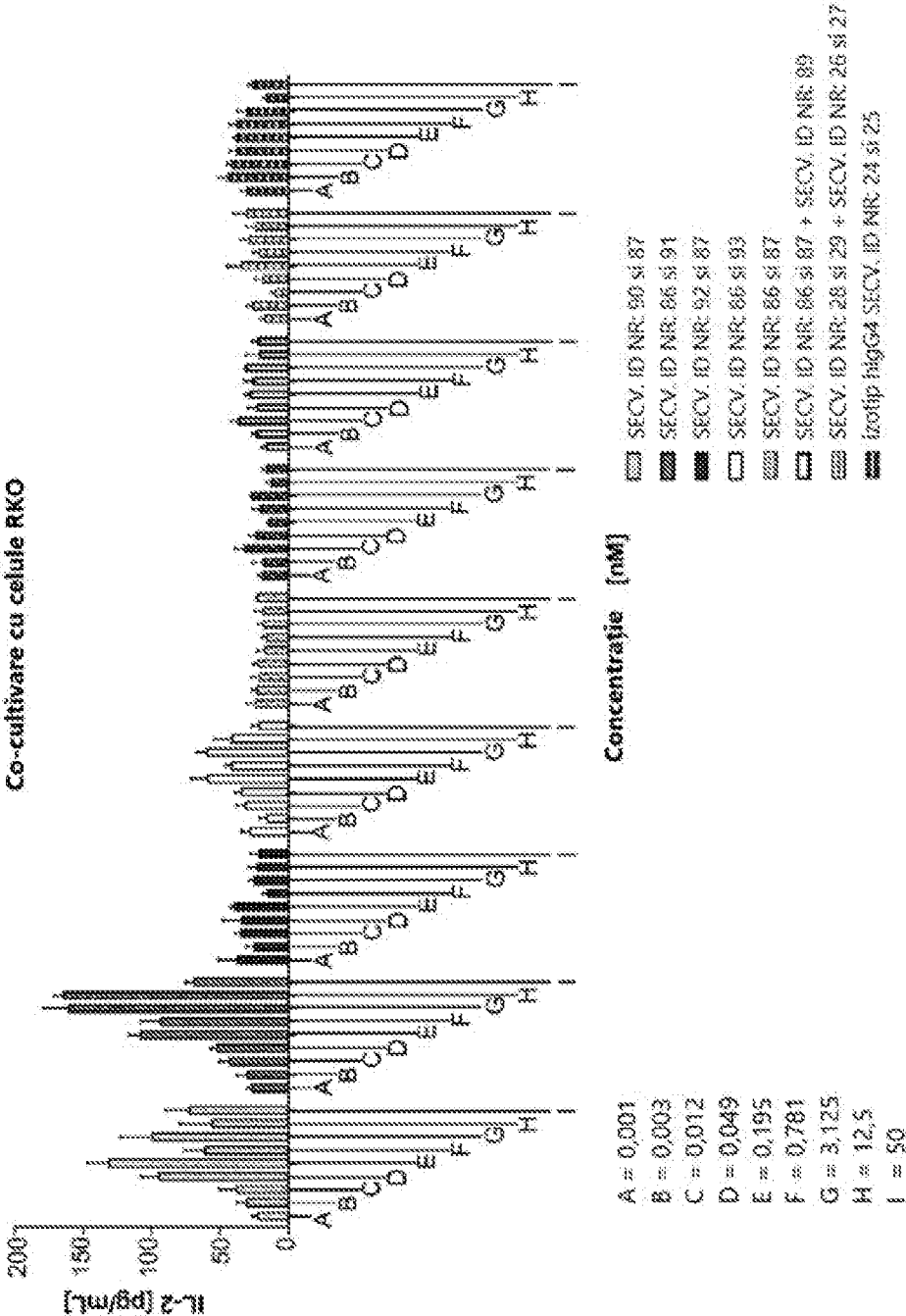


Figura 10 (Continuare)

Co-cultivare cu celule HCC827

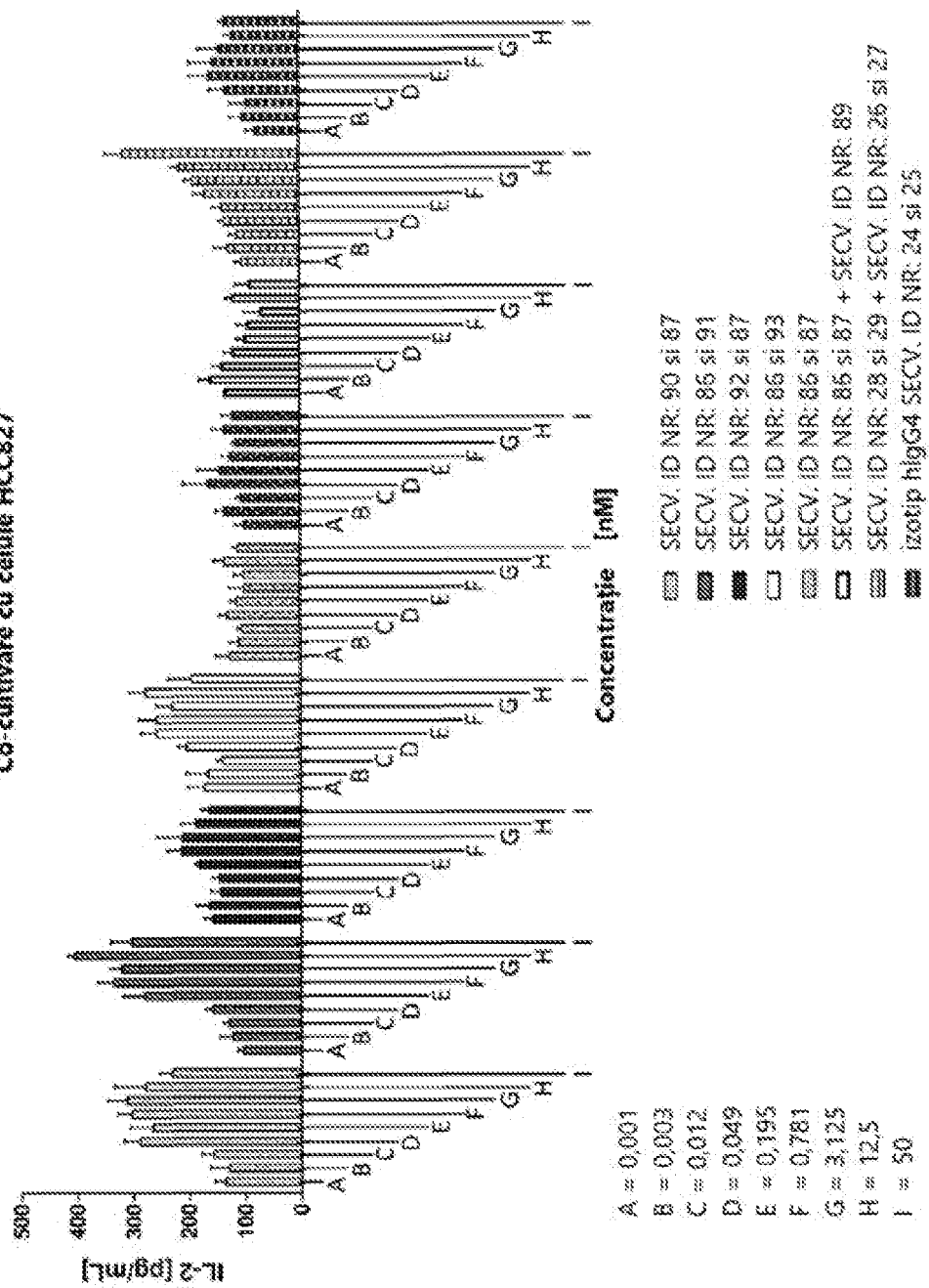


Figura 10 (Continuare)

Co-cultivare cu celule Hep-G2

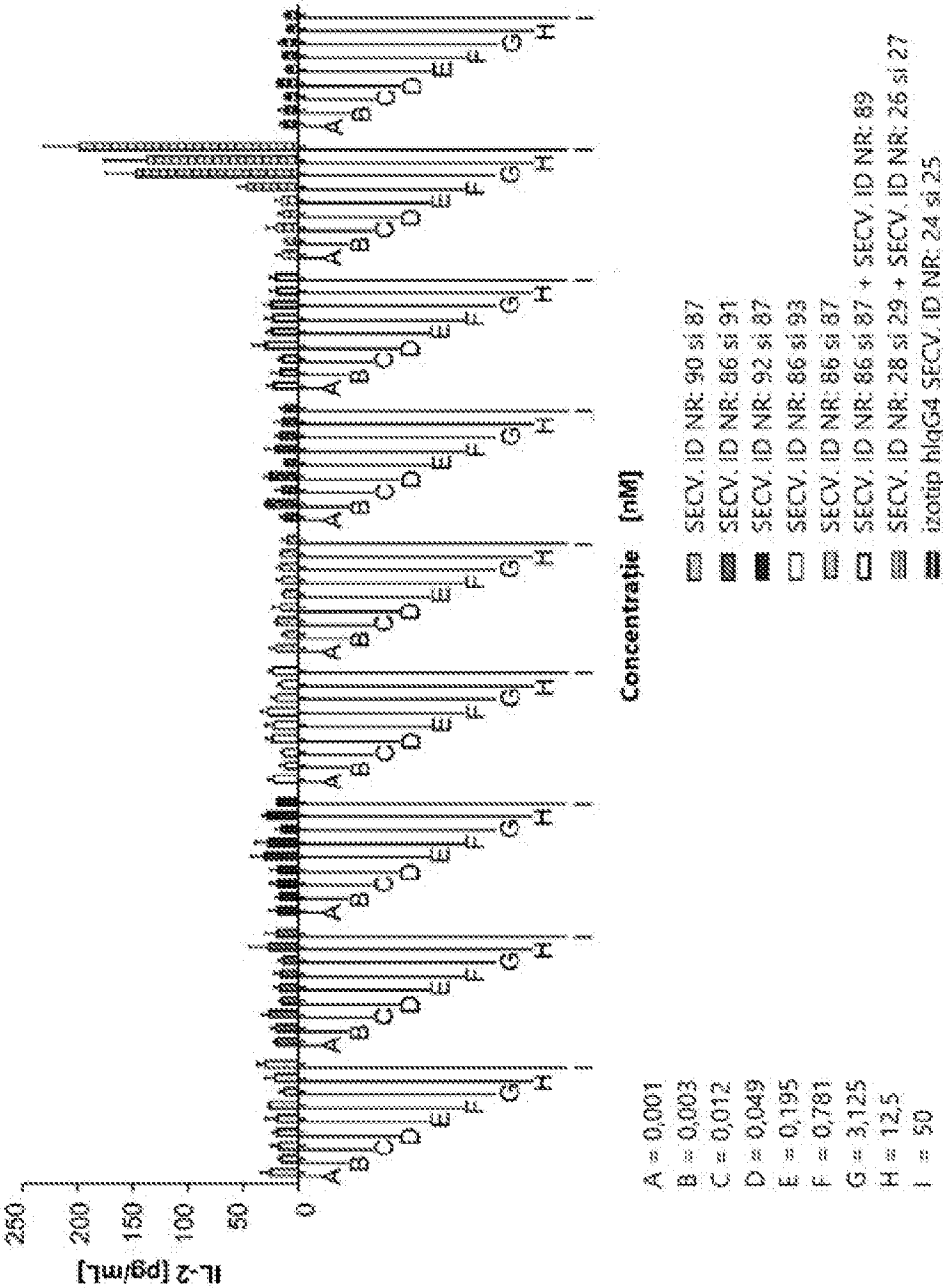


Figura 11A

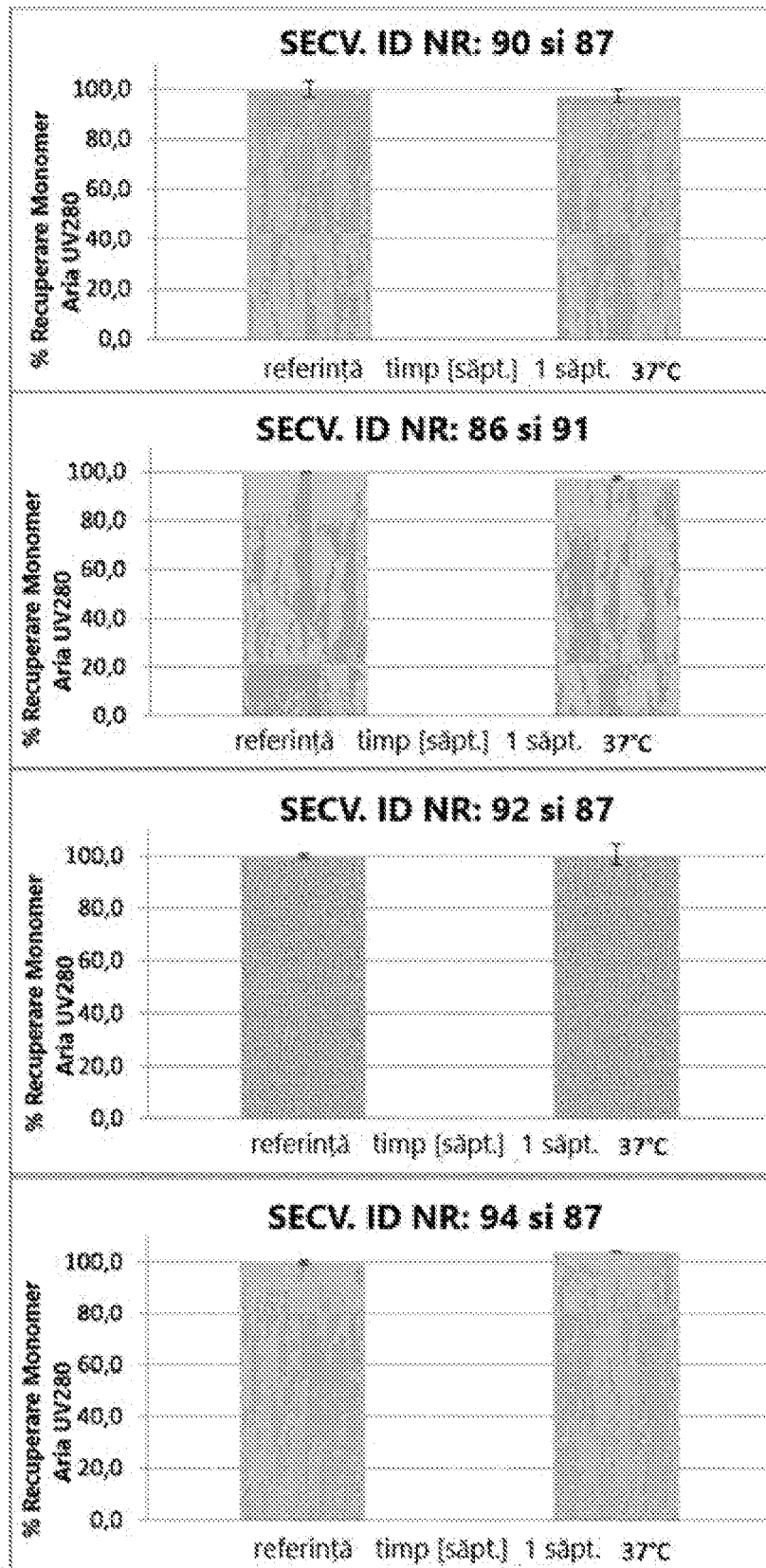


Figura 11A (Continuare)

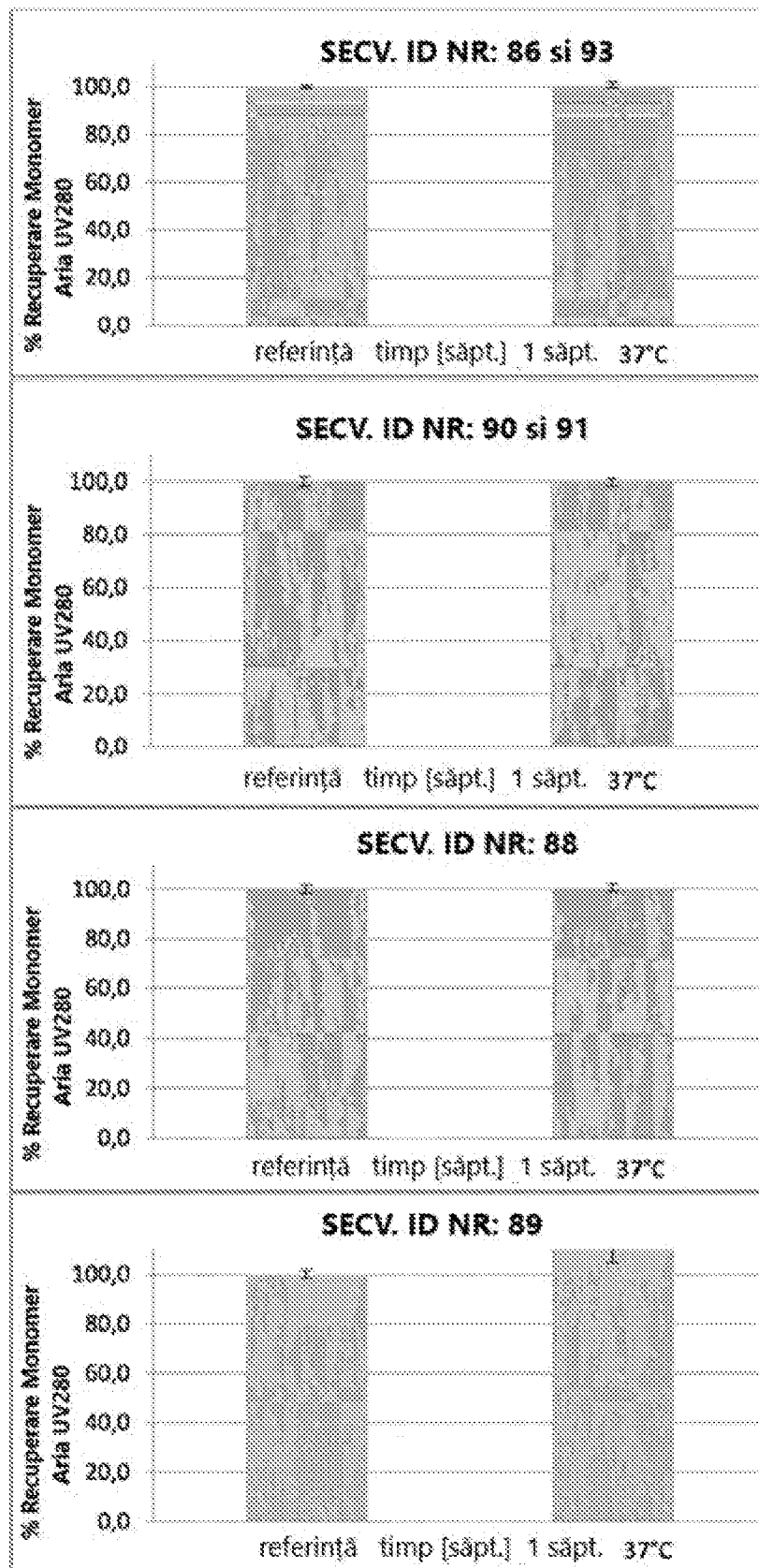


Figura 11B

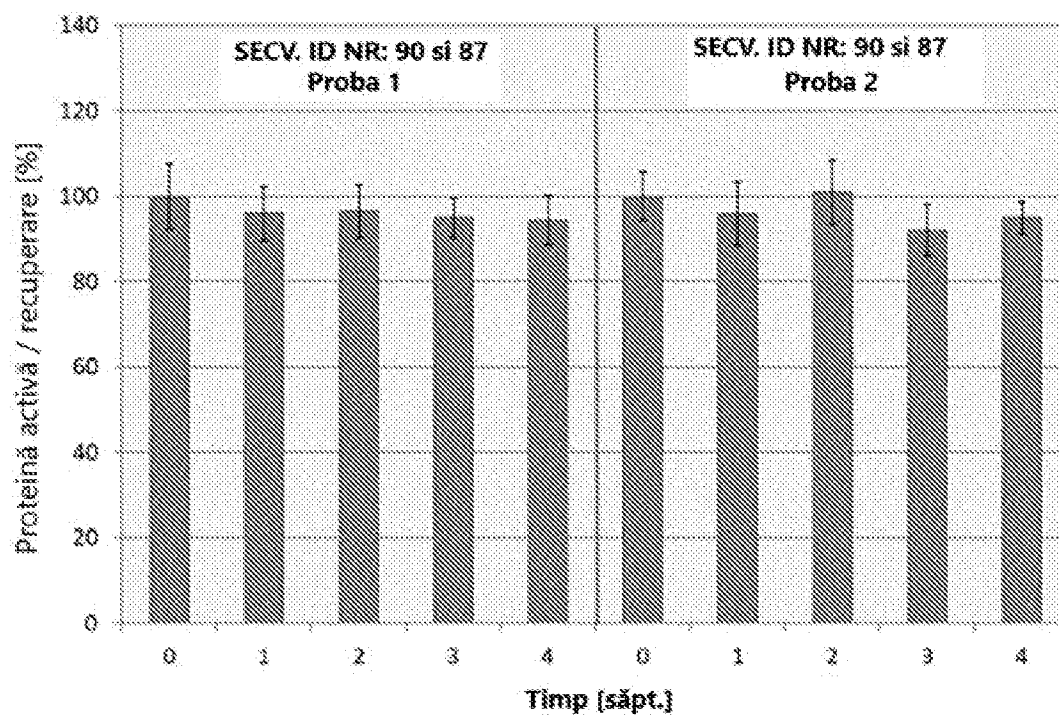


Figura 12A

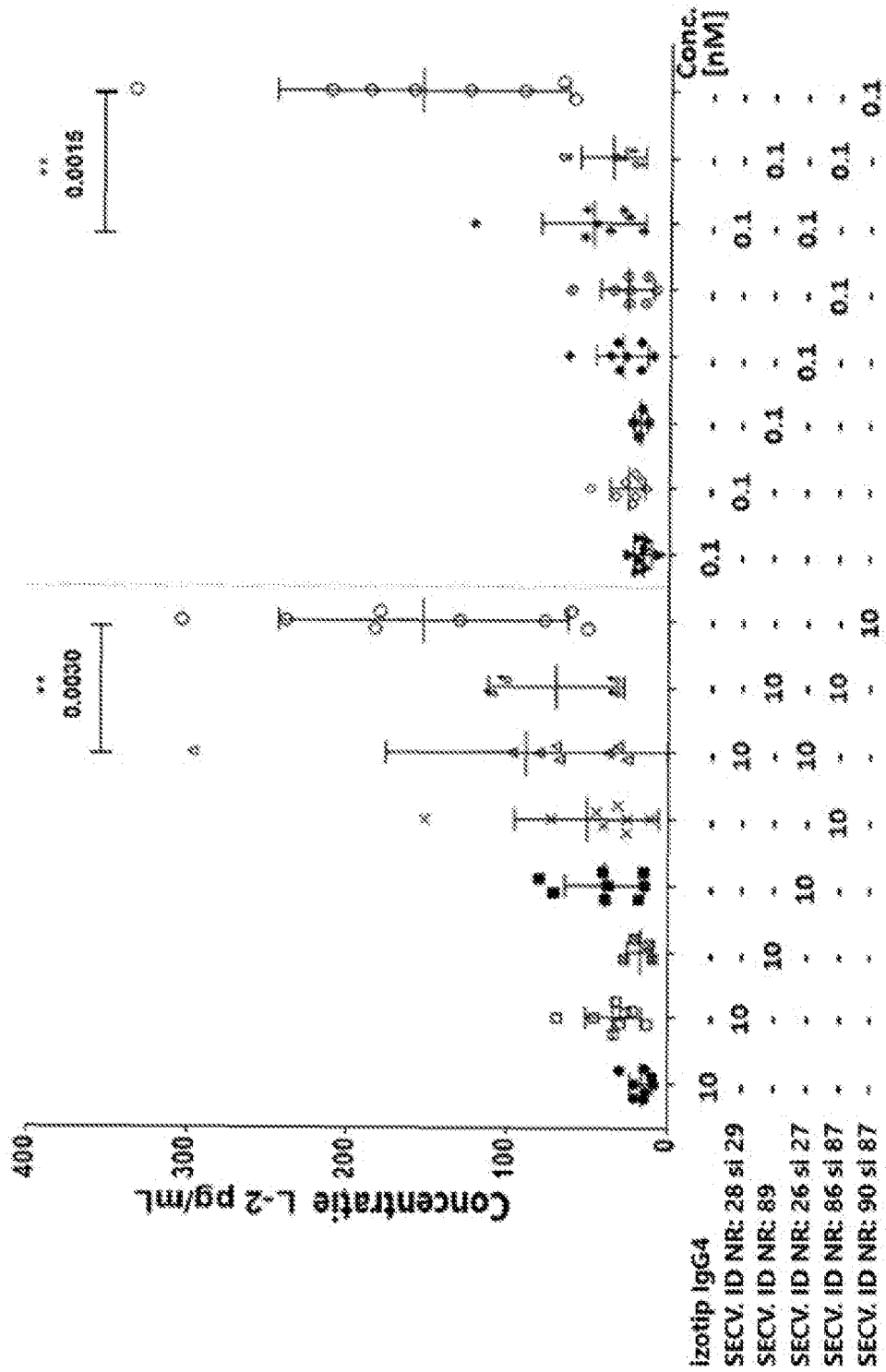


Figura 12B

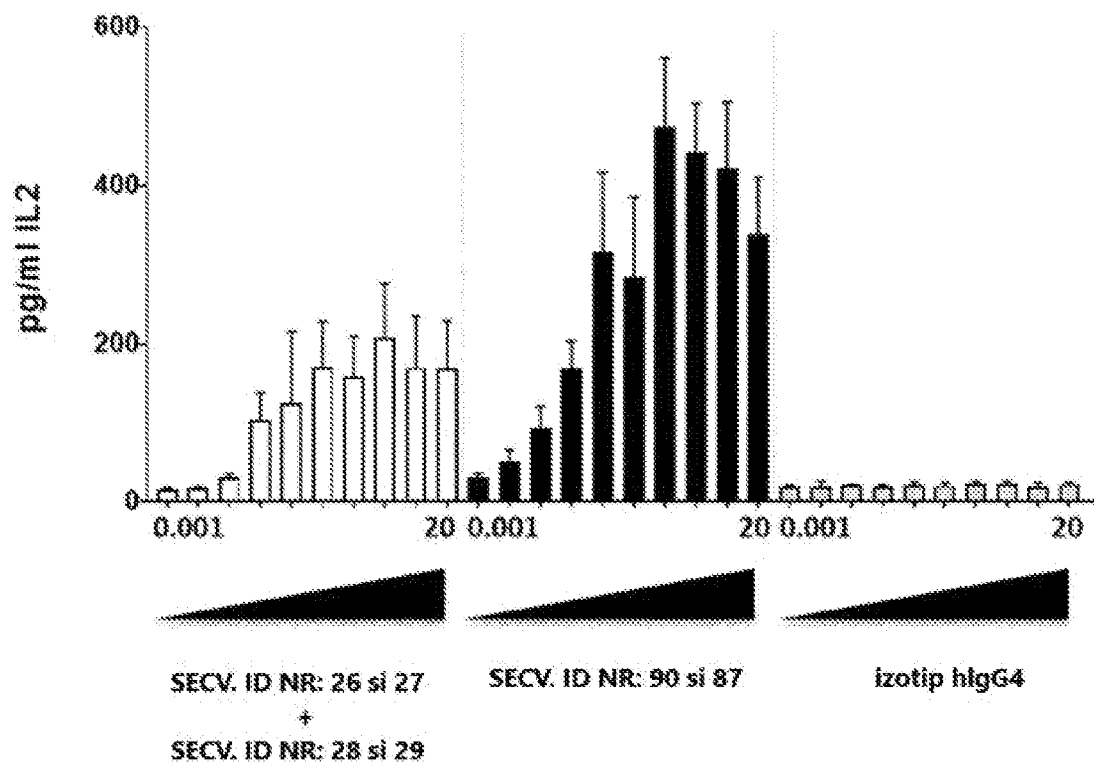


Figura 13

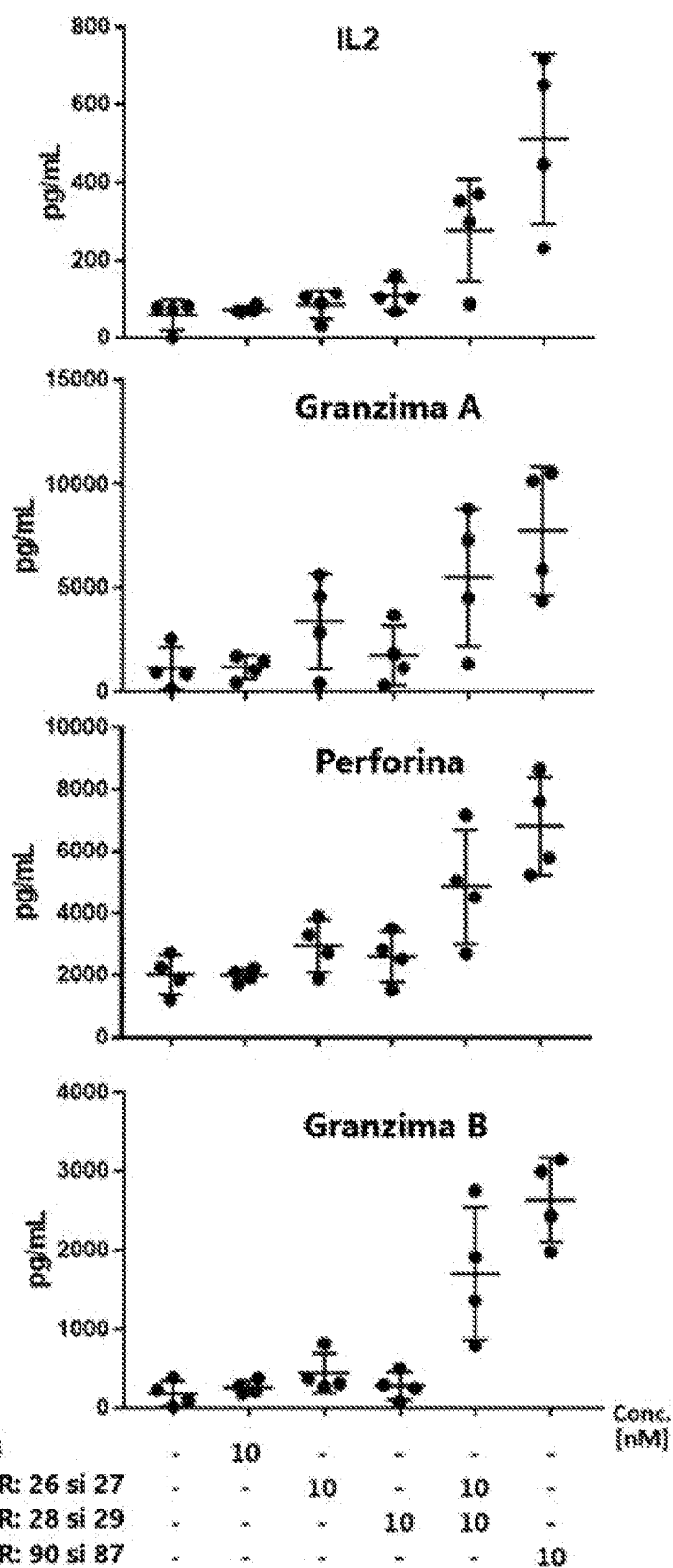
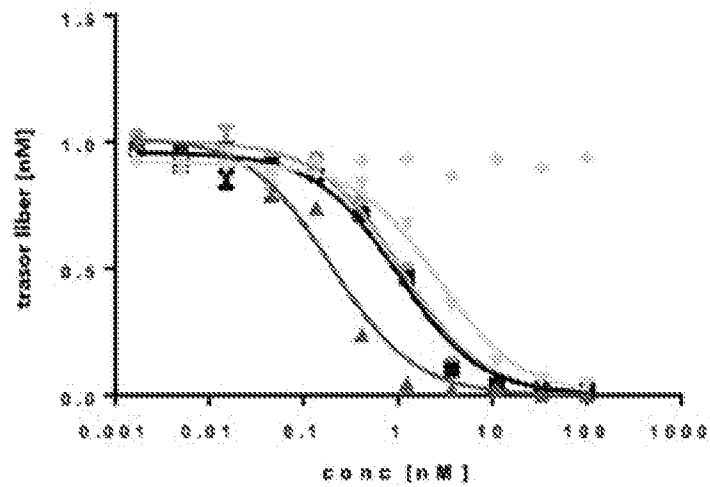
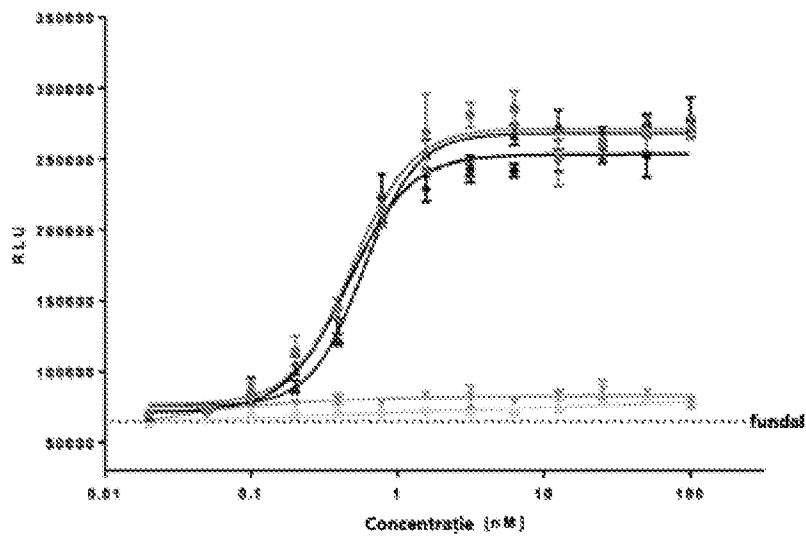


Figura 14



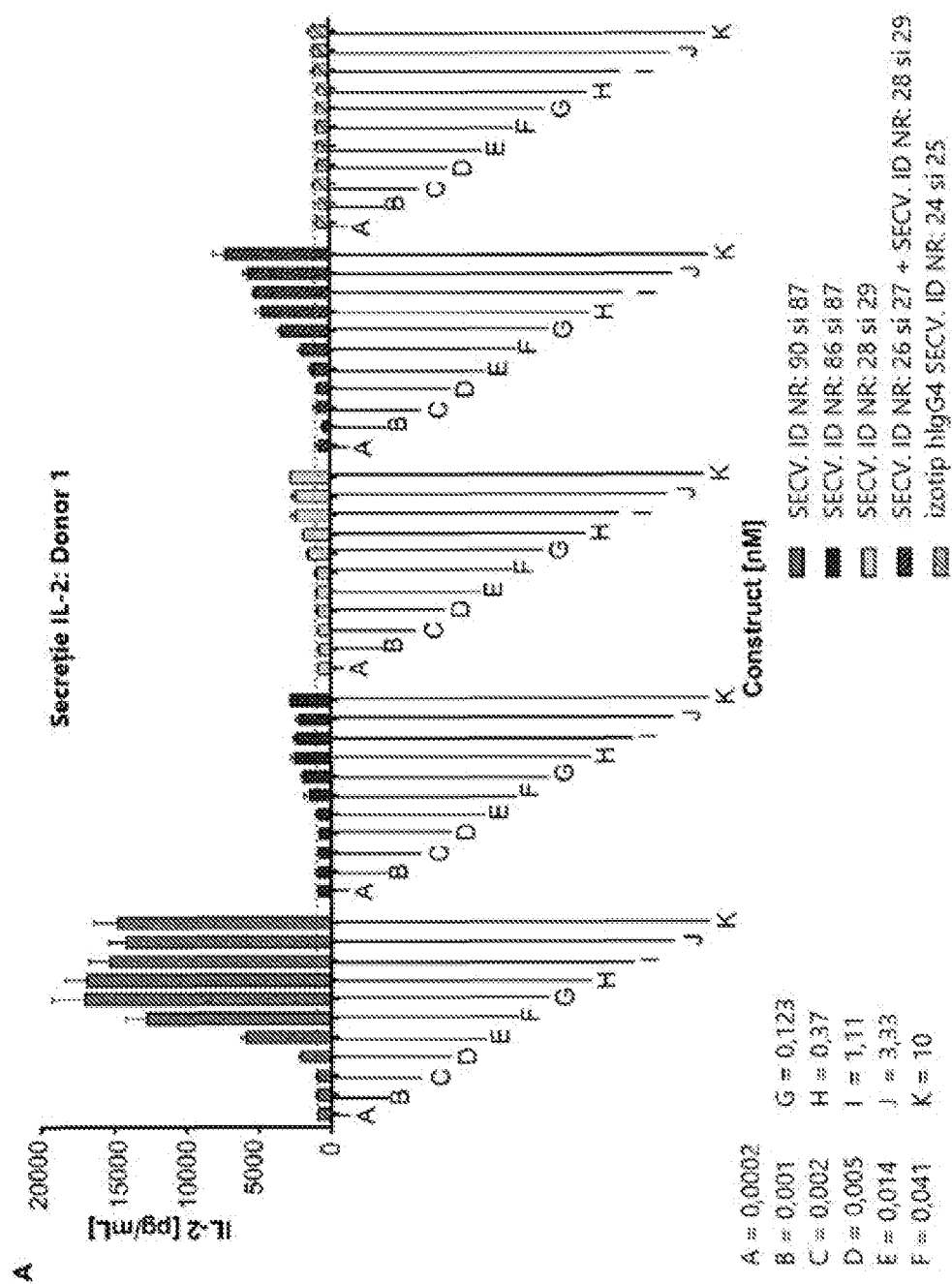
- SEC.V. ID NR: 90 si 87
- SEC.V. ID NR: 86 si 91
- SEC.V. ID NR: 28 si 29
- SEC.V. ID NR: 42
- SEC.V. ID NR: 86 si 87

Figura 15



- SEC.V. ID NR: 90 si 87
- SEC.V. ID NR: 86 si 87
- SEC.V. ID NR: 28 si 29
- SEC.V. ID NR: 28 si 27 + SEC.V. ID NR: 28 si 29
- isotip hlg64 SEC.V. ID NR: 24 si 25

Figura 16



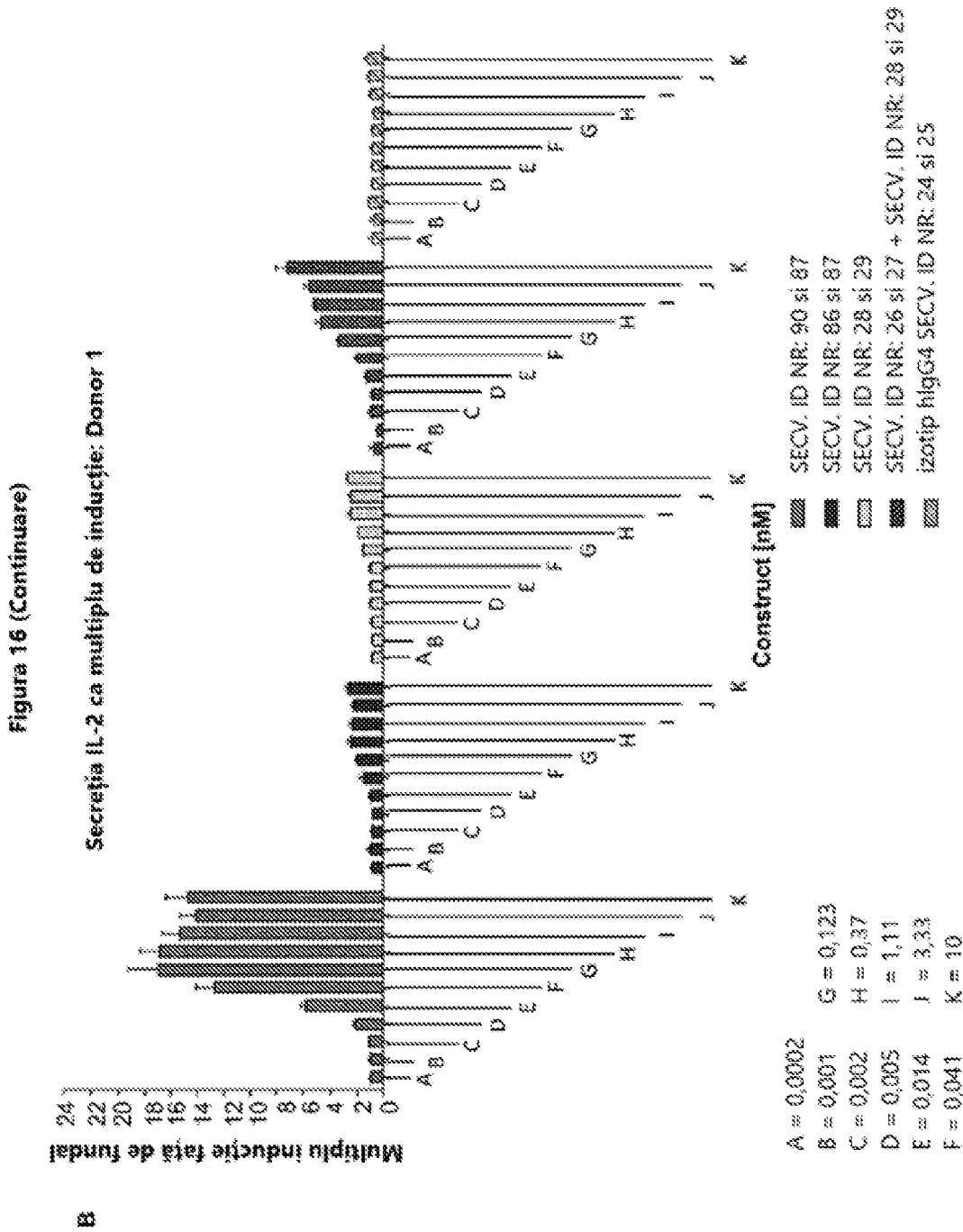


Figura 16 (Continuare)

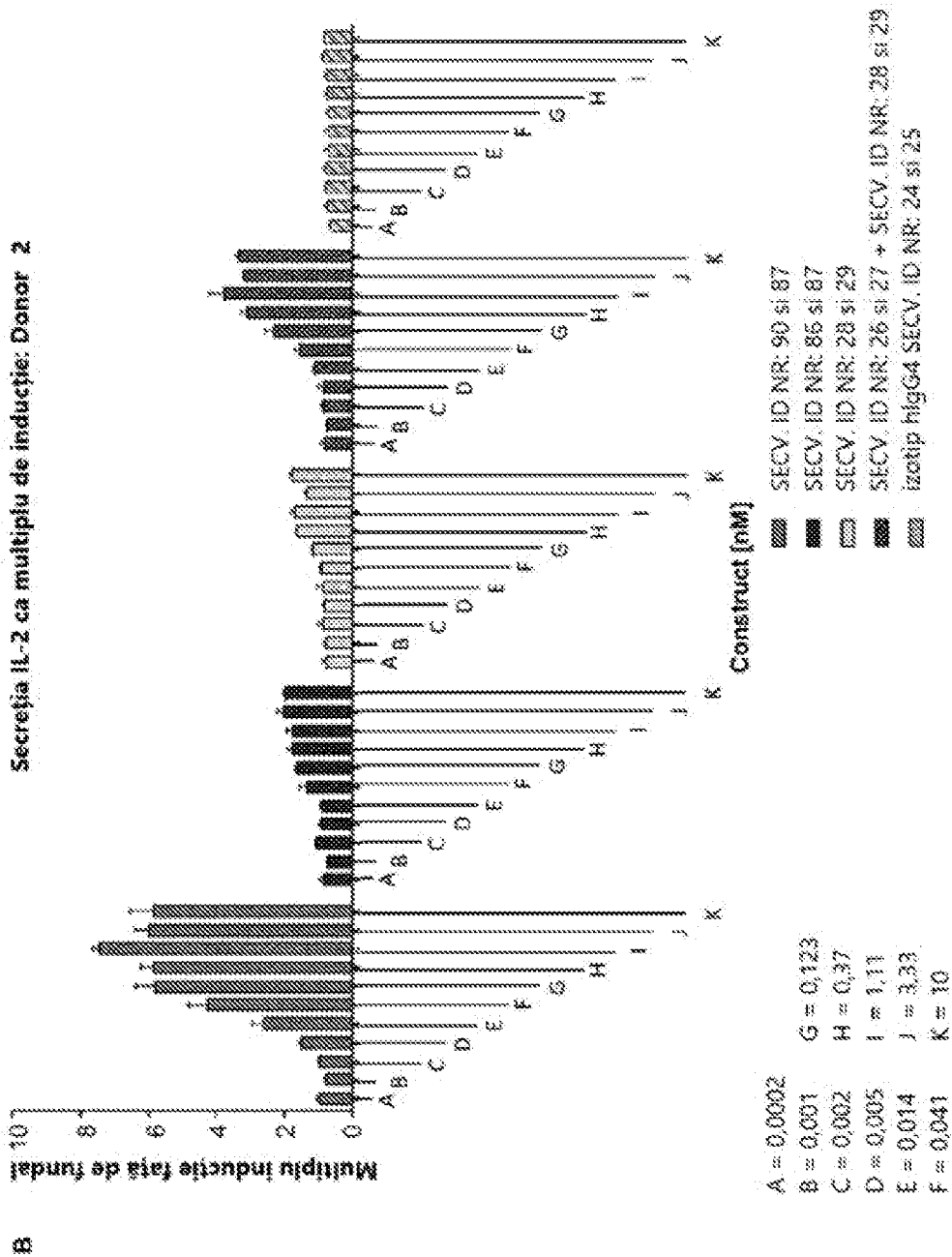
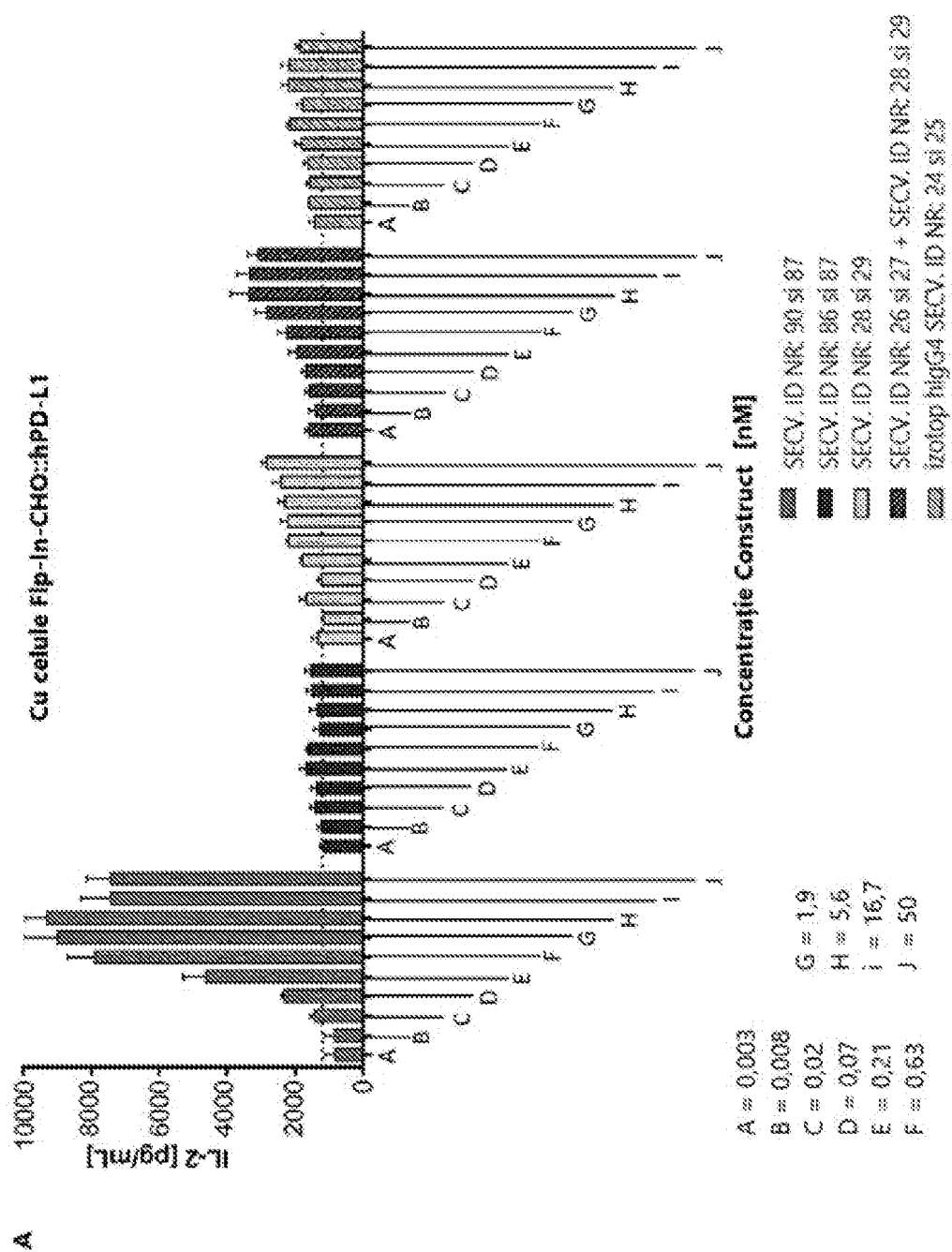
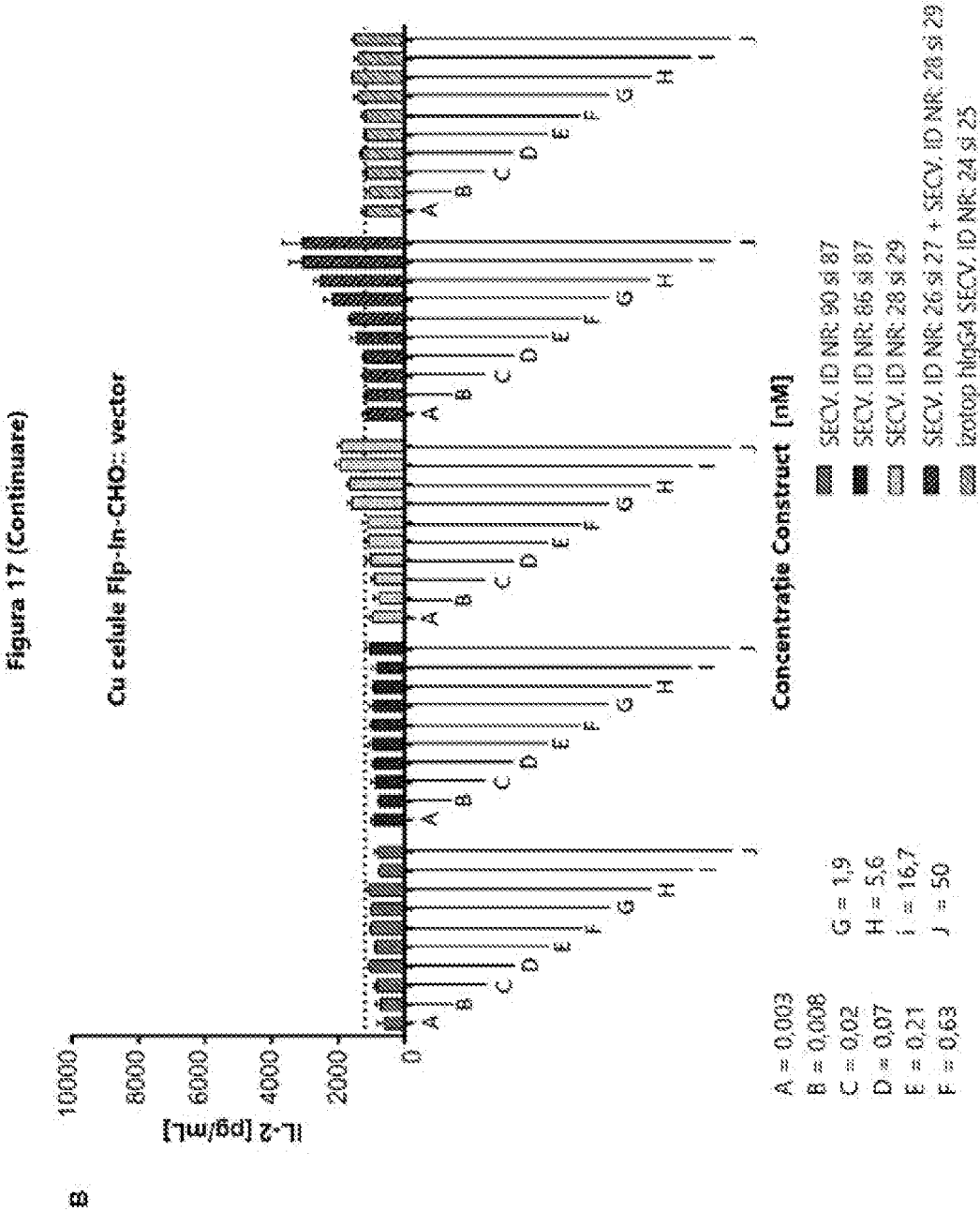
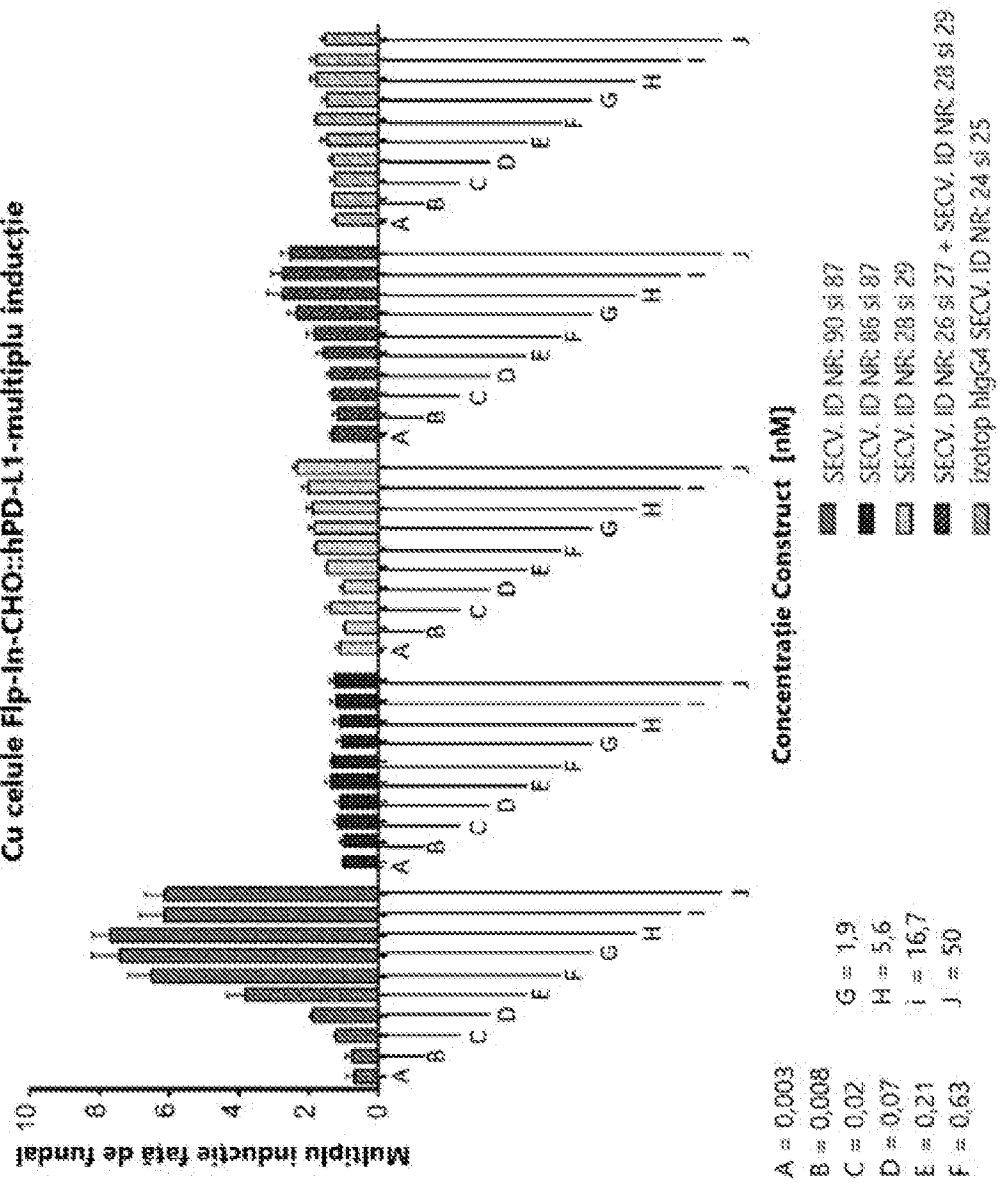


Figura 17







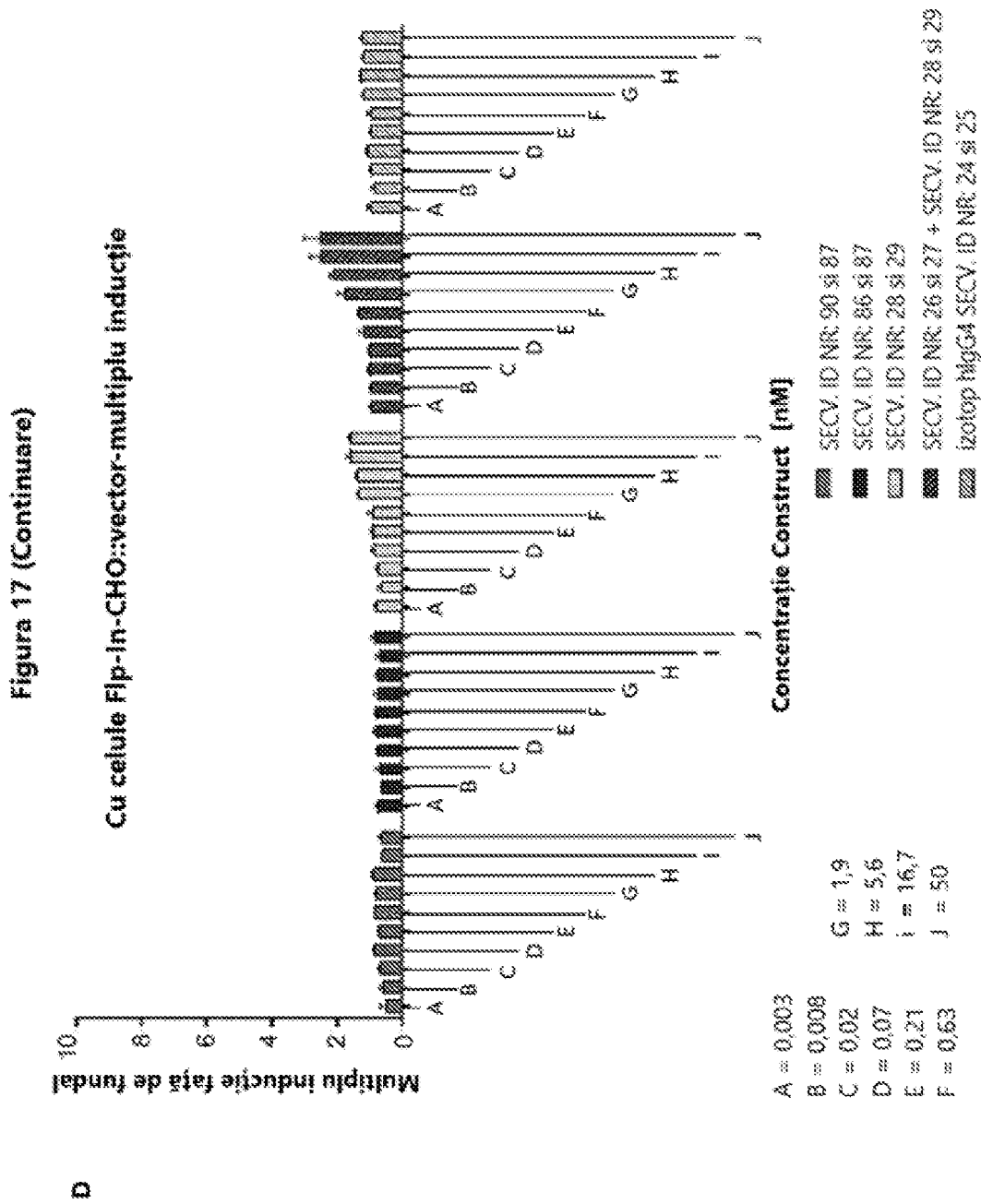


Figura 18

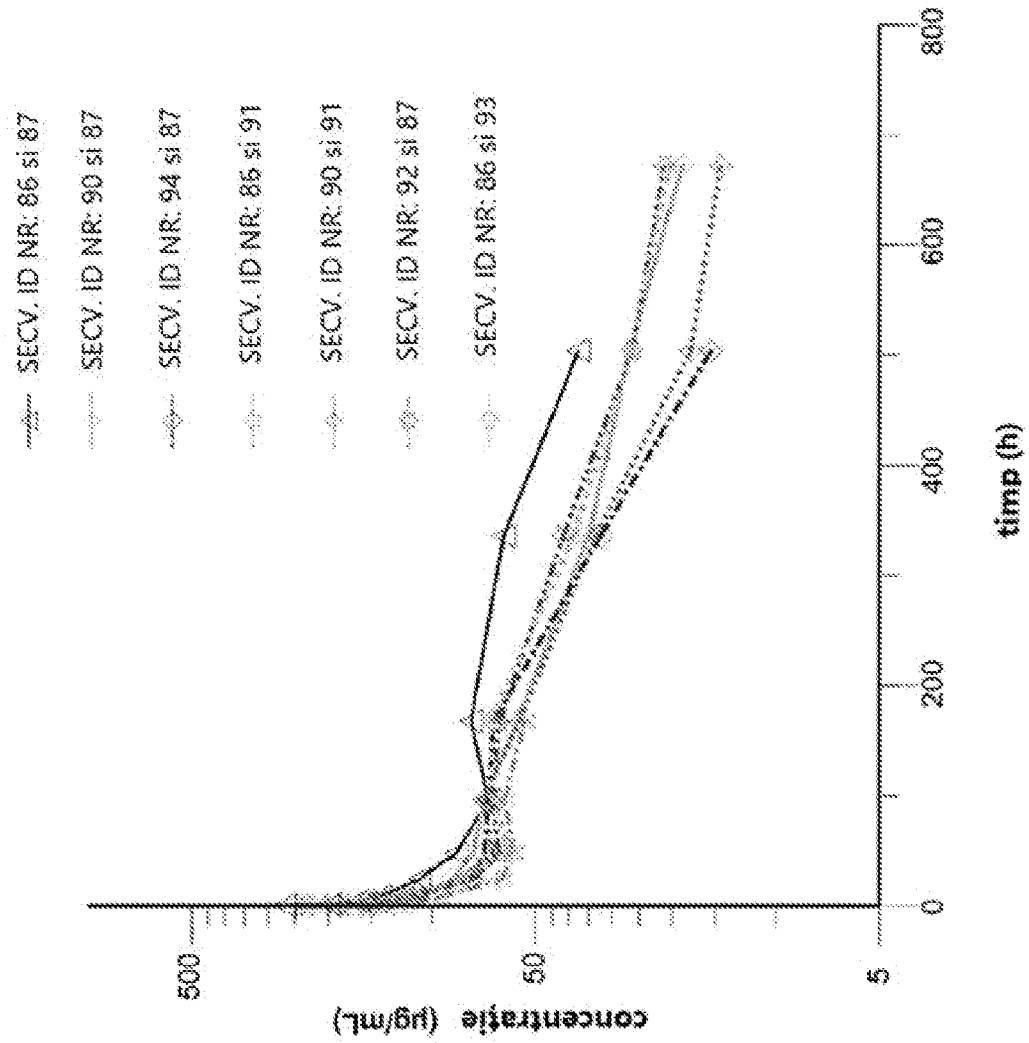


Figura 19

